



УДК 577.113.4;547.97;54.057

ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ МАРКИРОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ДВУХИНДИКАТОРНОГО ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА НА БИОЧИПЕ

© 2019 г. В. Е. Шершов*, Р. А. Мифтахов*, В. Е. Кузнецова*, Э. Н. Тимофеев*,
И. В. Гречишникова*, М. А. Спицын*, Т. О. Гусейнов*, С. А. Лапа*,
А. С. Заседателев*, А. В. Чудинов*.[#]

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

Поступила в редакцию 12.12.2018 г.

После доработки 13.12.2018 г.

Принята к публикации 15.12.2018 г.

Осуществлен синтез молекулярной конструкции на основе полисульфированного индокарбоцианинового красителя и лизина для флуоресцентного маркирования олигонуклеотидных зондов, предназначенных для иммобилизации на подложку олигонуклеотидных биочипов.

Ключевые слова: индокарбоцианиновые красители, лизин, олигонуклеотиды, флуоресцентное маркирование, биочипы

DOI: 10.1134/S0132342319030059

Двухиндикаторный метод гибридационного анализа НК служит способом, повышающим надежность молекулярно-генетических исследований. В этом методе анализируемая проба содержит маркер, флуоресцирующий в ближней ИК-области спектра, а олигонуклеотидный зонд, находящийся в ячейке, маркирован оптически-независимым красителем с максимумом флуоресценции на длине волны ~550 нм. Флуоресцентное маркирование олигонуклеотидных зондов позволит вычислять их концентрацию в ячейке биочипа и проводить корректировку сигналов в ячейках, в которых образовались совершенные и несовершенные дуплексы [1].

Нами предложена молекулярная конструкция (XIII) на основе индокарбоцианинового красителя (Су3) и аминокислоты лизин, которая содержит активированную карбоксильную группу и защищенную алифатическую аминогруппу. Карбоксильная группа предложенной конструкции предназна-

на для связывания с олигонуклеотидным зондом, содержащим амиолинкер, а аминогруппа служит для иммобилизации флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда на полимерную подложку или в полисахаридную ячейку биочипа (рис. 1). Выбор полисульфированного индокарбоцианинового красителя (X) с реакционно-способной карбоксильной группой в положении 3 индоленинового фрагмента обусловлен его повышенной водорастворимостью, фотостабильностью и хемостойкостью, а также спектрально-люминесцентными характеристиками и требуемым оптическим диапазоном флуоресценции в области 550 нм. Кроме того, введение карбоксильного заместителя в положение 3 индоленинового фрагмента позволило синтезировать водорастворимый краситель с четырьмя симметрично-расположенными сульфогруппами, что привело к значительному увеличению квантового выхода флуоресценции по сравнению с коммерчески-доступным Су3, содержащим две сульфогруппы [2] (табл. 1).

Сокращения: DMF – диметилформамид; DSC – *N,N'*-дисулцинимидилкарбонат; Tr – тритил; TrCl – тритилхлорид; ИК – инфракрасный; НК – нуклеиновая кислота.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-98-00; факс +7 (495) 135-14-05; эл. почта: chud@eimb.ru).

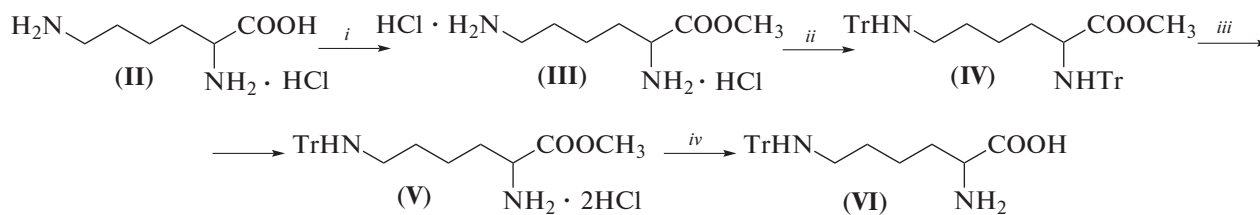


Схема 1. Схема синтеза N^ϵ -третилизина. Условия: *i* – MeOH, AcCl, 20°C, 18 ч; *ii* – TrCl, Et₃N, CHCl₃, 20°C, 3 ч; *iii* – 5 М HCl, (CH₃)₂CO, $t_{\text{кип}}$, 1 ч; *iv* – 1 М NaOH, $t_{\text{кип}}$, 5 мин.

Нами осуществлен многостадийный синтез N^ϵ -третилизина (**VI**) из лизин гидрохлорида (**II**) (схема 1). Использование тритильной группы в качестве защитной группировки для ϵ -аминогруппы лизина предполагает проведение предварительной этерификации карбоксильной группы путем ее превращения в сложный эфир (**III**). Именно использование метилового эфира лизина помогает провести реакцию тритилирования по обеим аминогруппам молекулы, затем снять эту защиту с карбоксильной группы, не затронув остальные защитные группы. Метилловый эфир лизина (**III**) синтезировали с количественным выходом действием смеси метилового спирта и ацетилхлорида нагреванием при 40°C в течение 4 ч [3]. Дитритилирование гидрохлорида (**III**)

проводили по стандартной методике действием хлороформного раствора тритилхлорида в присутствии триэтиламина [4, 5]. Селективное детритилирование α -аминогруппы лизина (**IV**) проводили действием 5 М соляной кислоты в ацетоне [5]. Последующий щелочной гидролиз метилового эфира (**V**) проводили действием 1 М водного раствора гидроксида натрия [5].

Нами предложен и осуществлен синтез полисульфированного индокарбоцианинового красителя (**X**), основанный на двухстадийной конденсации солей индоленина (**VII**), (**IX**) и N,N' -дифенилформамидина (**VIII**) в смеси уксусный ангидрид–уксусная кислота при добавлении в качестве конденсирующего агента безводного ацетата калия (схема 2) [6–8]. Молеку-

Таблица 1. Спектральные характеристики индокарбоцианиновых красителей

Соединение	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{em}}$	Стоксов сдвиг	$\epsilon \times 10^{-5}$, л моль ⁻¹ см ⁻¹	Φ^* , %
		нм				
(X)	PBS	552	566	14	1.55 ± 0.03	28
	MeOH	554	569	15	1.6 ± 0.02	39
(XI)	PBS	553	567	14	1.38 ± 0.03	59
	MeOH	558	572	14	1.5 ± 0.03	54
(XIIIa)	PBS	554	568	14	1.31 ± 0.03	56
	MeOH	558	572	14	1.43 ± 0.02	52
(XIIIб)	PBS	552	567	15	1.49 ± 0.03	32
	MeOH	558	573	15	1.52 ± 0.02	37

* Квантовый выход измеряли относительно красителя Су3 (GE Healthcare), $\Phi = 0.15$ в PBS при 25°C [2].

лярную конструкцию (XI) получали реакцией конденсации красителя (X) и N^ε-тритиллизина (VI) с предварительной активацией карбоксильной группы красителя действием DSC в DMF. Использование конъюгата (XI) в виде его активированного эфира для флуоресцентного маркирования олигонуклеотидов не увенчалось

успехом, скорее всего из-за возможного экранирования реакционного центра молекулы соседними с ним группами атомов. Для снижения пространственных затруднений в молекуле карбоксильную группу конъюгата (XI) дополнительно амидировали 6-аминокапроновой кислотой (XII).

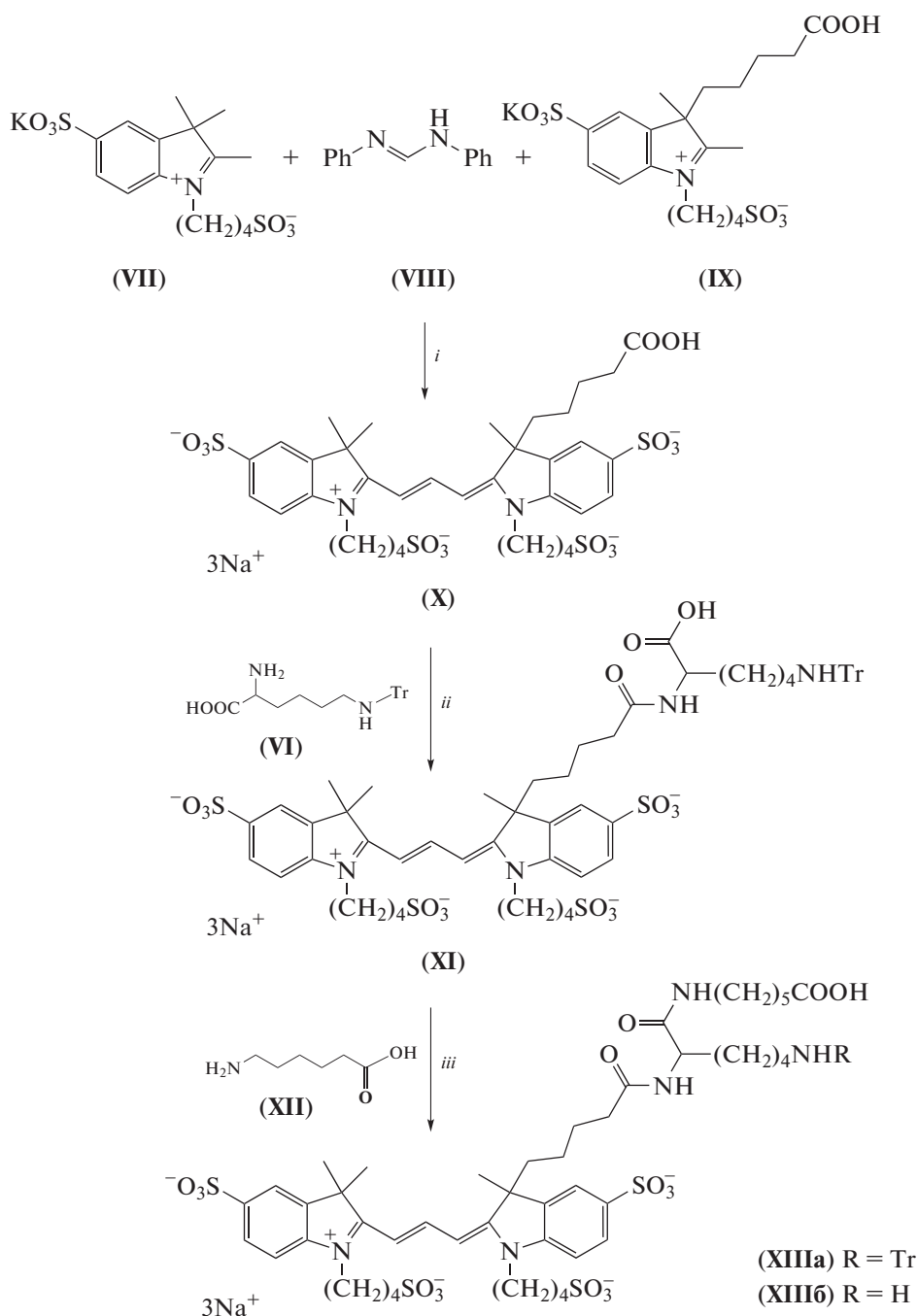


Схема 2. Схема синтеза молекулярной конструкции на основе полисульфированного индокарбодиазинового красителя и N^ε-тритиллизина. Условия: *i* – Ac₂O, AcOH, 118°C, 2 ч (1 стадия), Ac₂O, AcOH, AcOK, 118°C, 4 ч (2 стадия); *ii* – DSC, DMF, 20°C, 4 ч; *iii* – DSC, DMF, 20°C, 4 ч.

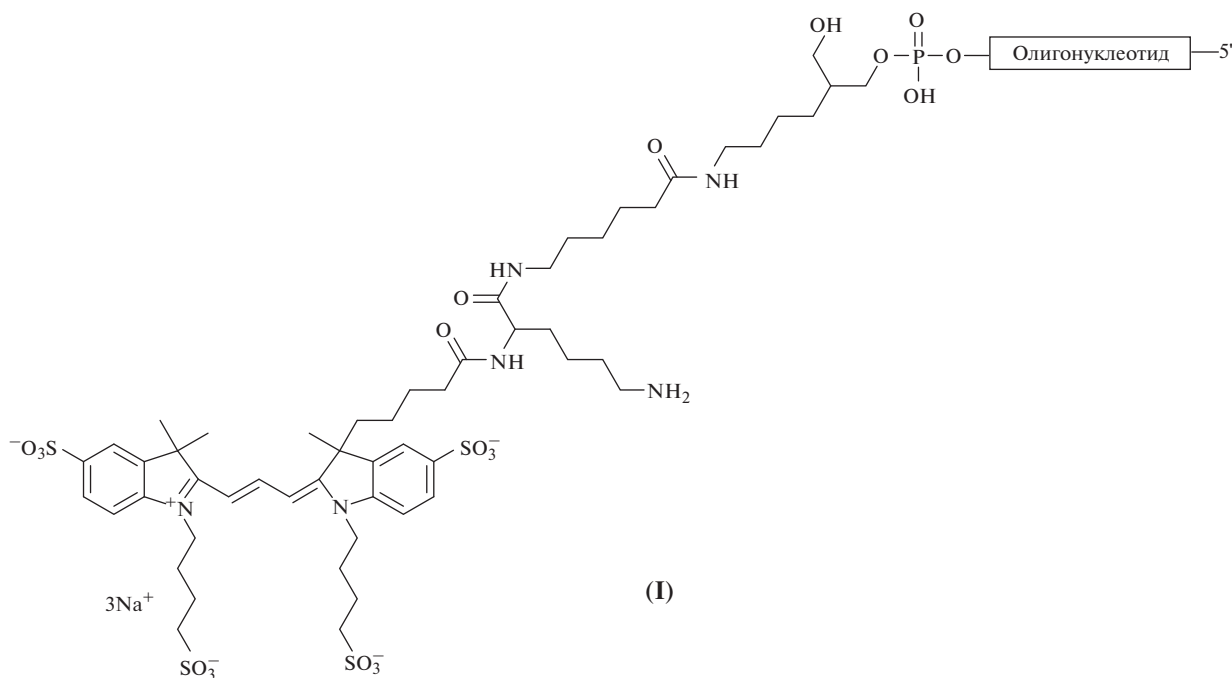


Рис. 1. Строение флуоресцентно-меченного олигонуклеотидного зонда.

Для всех индокарбоцианиновых красителей (X), (XI), (XIII) найден молярный коэффициент поглощения (ϵ) и относительный квантовый выход флуоресценции (Φ) в метаноле и водном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) (10 мМ калий фосфатный буфер, 0.9% NaCl, pH 7.4) (табл. 1).

Конъюгат краситель – лизин (XIII) переводили в активную форму в виде *para*-нитрофенилового эфира и конденсировали в водно-органической среде с олигонуклеотидными зондами, содержащими аминлинкер с C6-спейсером (рис. 1). Детритилирование ϵ -аминогруппы лизинового фрагмента красителя проводили нагреванием при 90°C в течение 45 мин натрий-цитратного буферного раствора (15 мМ, pH 5.5) флуоресцентно-меченного олигонуклеотида. Строение промежуточных и целевых соединений подтверждено данными УФ-, ^1H -ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Полученные таким образом модифицированные олигонуклеотидные зонды (I) будут использованы для проведения нормировки гибридизационных сигналов на биочипах [9].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-04-02062 А и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых

и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2018–2020 гг. (регистрационный номер СП-274.2018.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pan'kov S.V., Chechetkin V.R., Somova O.G., Antonova O.V., Moiseeva O.V., Prokopenko D.V., Yurasov R.A., Gryadunov D.A., Chudinov A.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2009. V. 27. P. 235–244.
2. Hughes L.D., Rawle R.J., Boxer S.G. // PLoS One. 2014. V. 9. e87649.
3. Hunt D.F., Yates J.R., Shabanowitz J., Winston S., Hauer Ch.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 6233–6237.
4. Bezas B., Zervas L. // J. Am. Chem. Soc. 1961. V. 83. P. 719–722.

5. *French Body Corporate "Roussel Uclaf"*. Lysine derivatives. Patent GB867788, 1958.
6. Кузнецова В.Е., Чудинов А.В. // Изв. АН, Сер. хим. 2008. № 3. С. 595–598.
7. Кузнецова В.Е., Лукьянова Т.А., Василисков В.А., Харитонова О.В., Чудинов А.В., Заседателев А.С. // Изв. АН, Сер. хим. 2007. № 12. С. 2355–2359.
8. Kuznetsova V.E., Vasiliskov V.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Mend. Commun.* 2008. V. 18. № 3. P. 138–140.
9. Мифтахов Р.А., Лапа С.А., Шериов В.Е., Заседателева О.А., Гусейнов Т.О., Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Мамаев Д.Д., Лысов Ю.П., Барский В.Е., Тимофеев Э.Н., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Биофизика*. 2018. Т. 63. С. 661–668.

Fluorescent Labeling of Oligonucleotide Probes for Double Indicator Microarray Hybridization Analysis

V. E. Shershov*, R. A. Miftakhov*, V. E. Kuznetsova*, E. N. Timofeev*, I. V. Grechishnikova*,
M. A. Spitsyn*, T. O. Guseinov*, S. A. Lapa*, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*^{*,#}

[#]Phone: +7(499)135-98-00; fax: +7(495)135-14-05; e-mail: chud@eimb.ru

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

Herein, we present a synthesis of molecular construct based on the polysulfonated indocarbocyanine dye and the lysine. The chemical structure of the construct obtained enables fluorescent labeling of oligonucleotide probes designed for the immobilization on the oligonucleotide biochips.

Keywords: indocarbocyanine dyes, lysine, oligonucleotides, fluorescent labeling, microarray