



УДК 577.113.4;577.2.08

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ C_у5-ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ ПО ТИПУ КАТЯЩЕГОСЯ КОЛЬЦА

© 2024 г. С. А. Лапа*[#], П. А. Чиркова*, С. А. Суржиков*, В. Е. Кузнецова*,
В. Е. Шершов*, А. В. Чудинов*

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

Поступила в редакцию 19.11.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 25.11.2023 г.

Синтезированы две пары C_у5-меченных трифосфатов dU и dC с аналогичными электронейтральными структурами флуорофора, различающиеся длиной углеводородного линкера между флуорофором и азотистым основанием. Проведен сравнительный анализ их субстратного поведения в варианте изотермической амплификации ДНК по типу катящегося кольца (RCA) с использованием ДНК-полимеразы Bst 3.0. Установлено, что нуклеотиды с длинным линкером между флуорофором и пиримидиновым основанием эффективнее встраиваются в растущую цепь ДНК, в то время как нуклеотиды с коротким линкером меньше ингибируют RCA. В каждой из пар dU и dC с аналогичными флуорофорами и линкерами большую плотность встраивания демонстрировали флуоресцентно-меченные производные уридина. Установлено, что при одновременном встраивании меченых dU и dC ингибирующий эффект не суммируется. Это дает основания для более внимательного изучения различных вариантов C_у5-dC с целью повышения чувствительности анализа при одновременном введении меченых dU и dC.

Ключевые слова: флуоресцентно-меченные пиримидиновые дезоксинуклеозидтрифосфаты, амплификация по типу катящегося кольца, введение метки в ДНК

DOI: 10.31857/S0132342324040157, EDN: MWASES

ВВЕДЕНИЕ

Распространение флуоресцентных меток позволило расширить спектр молекулярно-генетических исследований. Один из наиболее востребованных классов флуорофоров для введения меток в ДНК – цианиновые красители ряда C_у5. В настоящее время широко распространены меченые аналоги дезоксиуридинтрифосфата (C_у5-dU) с различными структурами C_у5-флуорофора

для введения метки непосредственно в процессе ферментативной амплификации. Аналоги дезоксицитидина (C_у5-dC) применяются гораздо реже в силу более сложного синтеза, и поэтому их субстратное поведение недостаточно изучено.

В последние годы уделяется все больше внимания разработке и внедрению методов амплификации нуклеиновых кислот в изотермическом режиме, без использования термоциклера. Предложено несколько разновидностей изотермической ампли-

Сокращения: RCA – амплификация по типу катящегося кольца (от англ. Rolling Circle Amplification); C_у5-dU – цианиновый аналог дезоксиуридина; C_у5-dC – цианиновый аналог дезоксицитидина.

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

фикации: метод катящегося кольца (RCA) [1], петлевая изотермическая амплификация (LAMP) [2], рекомбиназная полимеразная реакция (RPA) [3] и некоторые другие [4].

Использование флуоресцентных меток с высокими квантовыми выходами и возможность их введения в ДНК непосредственно в процессе амплификации позволяют повышать чувствительность и надежность диагностических систем.

Целью настоящей работы было определение степени ингибирования RCA и плотности встраивания в растущую цепь ДНК для двух пар трифосфатов дезоксиуридина (dU) и дезоксицитидина (dC), в каждой из которых пиримидиновое основание было модифицировано одним и тем же флуорофором. В качестве генетической мишени для амплификации использовали полногеномную ДНК одного из важных возбудителей пневмонии – золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезированы четыре пиримидиновых трифосфата дезоксинуклеозидов, содержащие аналогичные флуорофоры по 5-положению азотистого основания и различающиеся длиной линкера между азотистым основанием и флуорофором. Структуры флуорофоров с линкерами приведены на рис. 1. Далее по тексту аналоги dU и dC с коротким линкером обозначены литерой S, с длинным – литерой L. Выбор электронейтрального цвиттерионного флуорофора определялся полученными ранее данными о более эффективной встраиваемости в ПЦР таких нуклеотидов по сравнению с аналогами, несущими положительный или отрицательный суммарный заряд [5, 6]. Общая схема синтеза флуоресцентно-меченных производных Cy5-дезоксипиримидиновых dNTP описана ранее [7, 8].

Проводили реакцию амплификации по типу катящегося кольца (RCA от “Rolling Circle Amplification”) с неполным замещением природных dNTP на флуоресцентно-меченные аналоги. Концентрации Cy5-dNTP выбирали на основании данных по ингибированию ПЦР и PEX (Primer Extension Reaction, реакция удлинения праймера) [9]. Для проведения RCA конструировали так называемый “кольцевой олигонуклеотид” длиной 90 нт, специфичный к участку гена *ebpS* *S. aureus*. Для образования кольца использовали

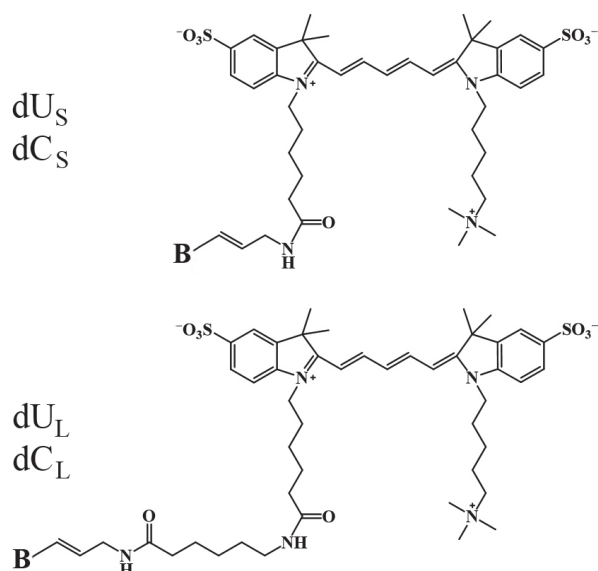


Рис. 1. Флуорофор и линкер, связывающий его с 5-положением азотистого основания. В – азотистое основание. Остальные пояснения приведены в тексте.

геномную ДНК *S. aureus* и лигазу T4. Образовавшийся в результате лигирования кольцевой олигонуклеотид (90 нт) использовали в дальнейших исследованиях в качестве матрицы для амплификации.

На рис. 2а показано накопление флуоресцентного сигнала в процессе проведения RCA в режиме реального времени (на примере dU_L и dC_L). Видно, что при одновременном введении в реакцию обоих модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов скорость накопления продукта имеет промежуточное значение по сравнению с индивидуальным введением в реакцию dU_L и dC_L (при одинаковой суммарной концентрации). Эта же зависимость характерна для dU_S и dC_S. Для измерения скорости накопления продукта использовали параметр “эффективность амплификации” E_t , позволяющий оценить степень ингибирования RCA. E_t рассчитывали аналогично тому, как описано нами ранее [5], но относили к времени проведения реакции, а не к количеству циклов, как в ПЦР (поэтому данный параметр не может быть сравнен напрямую с эффективностью E в ПЦР). Большее значение показателя E_t соответствует большей скорости накопления продукта (табл. 1).

Для визуального контроля реакции использовали горизонтальный электрофорез с двухволновой (двухканальной) системой детекции. На рис. 2б

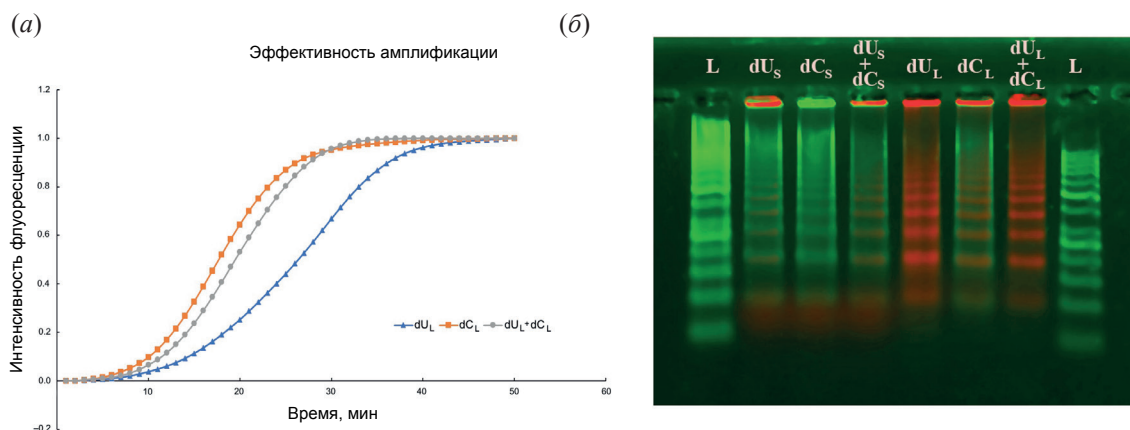


Рис. 2. (а) – Кинетика амплификации RCA на примере dU_L и dC_L как при индивидуальном, так и при совместном применении; (б) – электрофореграмма результатов RCA в двухканальном режиме возбуждения/детекции (“зеленый” канал 530/585 нм и “красный” канал 630/690 нм). L – маркер длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo, Латвия).

приведена электрофореграмма в двухволновом режиме, позволяющая визуализировать как суммарный продукт реакции, т.е. ДНК (“зеленый” канал, окрашивание SYBR Green), так и плотность встраивания метки (“красный” канал, флуоресценция Cy5 от встроившихся меченых нуклеотидов). Видно, что увеличение длины линкера способствовало увеличению плотности встраивания, при этом независимо от длины линкера в каждой паре (dU и dC) более высокую плотность встраивания показывали dU по сравнению с dC.

Проводили очистку продуктов реакции на микроколонках с мембранами на основе диоксида кремния для последующего измерения плотности встраивания метки спектрофотометрическим методом. Это позволило полностью удалить непрореагировавшие флуоресцентно-меченные трифосфаты и тем самым гарантировать получе-

ние сигнала только от меток, которые встроились в цепи ДНК в процессе их роста. В качестве коэффициента встраивания “K” использовали отношение поглощения образца на длине волны 647 нм (метка) к поглощению на 260 нм (ДНК). Выход продукта рассчитывали по измеренной оптической плотности очищенного продукта амплификации при длине волны 260 нм.

Таким образом, были получены результаты измерения кинетического показателя реакции (E_t – эффективность амплификации, позволяющая оценить степень ингибирования реакции при использовании модифицированных dNTP), выход продукта и плотность встраивания метки в ДНК. Реакцию амплификации и соответствующие измерения для каждого Cy5-dNTP проводили в трех повторностях, находили средние значения. Результаты измерений приведены в табл. 1.

Таблица 1. Показатели субстратной эффективности Cy5-меченных dU и dC

Тип dNTP (концентрация, мкМ)	Выход продукта, мкг	E_t	K
dU _S (32)	21.3	1.14	0.07
dC _S (32)	19.7	1.17	0.03
dU _S (16) + dC _S (16)	15.8	1.15	0.11
dU _L (32)	13.1	1.09	0.19
dC _L (32)	22.5	1.14	0.06
dU _L (16) + dC _L (16)	17.6	1.13	0.22

Примечание: E_t – эффективность амплификации, отнесенная к времени проведения реакции; K – коэффициент встраивания метки (пояснения в тексте).

Обнаружено, что в каждой паре dU и dC с аналогичной модификацией большую плотность встраивания показывает меченое производное dU. В то же время при использовании одновременного встраивания dU и dC при суммарной концентрации, которая была эквивалентна индивидуальной (как при использовании каждого трифосфата по отдельности), плотность встраивания увеличивалась. Это может говорить об отсутствии эффекта “суммарной концентрации” при ингибировании реакции и позволяет при меньших индивидуальных концентрациях Су5-меченных dU и dC (при использовании их в паре) получать сравнимую или большую плотность встраивания (при уменьшенном за счет уменьшения индивидуальных концентраций ингибирующем эффекте).

Удлинение линкера увеличивало способность полимеразы воспринимать модифицированные нуклеотиды в качестве субстрата, что позволило получить большую плотность встраивания метки на одну молекулу ДНК.

Полученные данные по влиянию длины линкера в RCA соответствуют таковым для ПЦР [5, 10]. Использование одновременного встраивания разноименных Су5-нуклеотидов способствует увеличению плотности встраивания метки и может быть полезно при анализе мишеней различного GC-состава, увеличивая чувствительность анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. Образцы геномной ДНК *S. aureus* были выделены и деконтаминированы на базе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk, Россия), как описано ранее [10]. В работе использовали ДНК *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Праймеры и другие олигонуклеотиды. Множественное выравнивание последовательностей гена *ebpS* *S. aureus* проводили с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Конструирование праймеров осуществляли с использованием сетевого ресурса www.idtdna.com, анализ специфичности праймеров проводили с помощью алгоритма BLAST (NIH, США). Для образования (в последующем процессе амплификации) кольцевого видоспецифичного олигонуклеотида синтезировали линейный олигонуклеотид длиной 90 нт, фосфорилированный по 5'-концу, представленный следующей последовательностью: 5'-Ph-ТТАГА-

GGCATGTGGTTATGCTAGCAACAGATAGACA-AGATGGAATGCAGATGACGATAGACGATAC-STGCCATCGTTTTGGCTTGCATTA-3', где Ph – фосфат. Для амплификации по типу катящегося кольца использовали два праймера: прямой 5'-CGATAGACGATACCTGCCATCG-3' и обратный 5'-ATCGTCATCTGCATTCCATC-3'. Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту, очистку производили на колонке BDS Hypersil C18 (Thermo, США).

RCA в режиме реального времени. Реакционная смесь содержала природные dNTP в концентрации 0.2 мМ каждого, а также меченые dNTP в концентрации 32 мкМ при индивидуальном введении в реакцию либо 16 мкМ каждого при совместном введении, 1.5 ед. Bst 3.0 ДНК-полимеразы и соответствующий реакционный буфер (NEB, США), кольцевой олигонуклеотид и праймеры в количестве 5 пмоль на реакционный объем, 10^4 копий на реакционный объем (20 мкл) геномной ДНК *Staphylococcus aureus*, а также необходимое количество $20\times$ EvaGreen (Biotium, США). Смешивание компонентов производили на льду для предотвращения преждевременной амплификации. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Gentier 96E (Tianlong, Китай) в режиме реального времени по следующей программе: 50 мин при 65°C при съемке сигнала флуоресценции 1 раз в минуту, далее режим хранения (10°C).

Очистка продуктов реакции от праймеров и dNTP. Продукты RCA очищали от праймеров и dNTP с помощью набора GeneGET Purification Kit (Thermo, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для очистки использовали продукты RCA, полученные из трех реакционных объемов (20 мкл \times 3) для каждого флуоресцентно-меченного dNTP, которые смывали с колонки GeneGET с помощью 10 мкл воды Milli-Q. Отсутствие в очищенном растворе ДНК меченых dNTP контролировали электрофоретически при возбуждении флуоресценции при длине волны 630 нм (необходимое условие для последующего измерения флуоресценции только от меток, встроившихся в растущую цепь ДНК).

Электрофорез в агарозном геле. Продукты RCA разделяли в 4%-ном агарозном геле (Agarose

LE, Helicon, Россия) в течение 20 мин при 10 В/см, для окрашивания использовали SYBR Green I (Molecular Probes, США). Визуализацию проводили с помощью системы гель-документирования ChemiScope 6200 Touch (Clinx Science Instruments, КНР) с помощью встроенных LED-светодиодов и светофильтров Green light excitation/emission (для общей детекции ДНК по окрашиванию SYBR Green I) и с помощью встроенных LED-светодиодов и светофильтров Red light excitation/emission, соответствующих характеристикам флуоресцентного красителя Cy5 (для избирательной детекции встроившихся флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов).

Спектрофотометрия. Измерения оптического поглощения проводили на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия) при длинах волн 260 и 647 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе синтезированы две пары Cy5-модифицированных dU и dC, которые различались между собой длиной линкера между азотистым основанием и флуорофором. Определены степень ингибирования RCA и плотность встраивания в растущую цепь ДНК для каждого из меченых dNTP с использованием в качестве матрицы полногеномной ДНК *S. aureus*. Показана возможность использования меньших индивидуальных концентраций меченых трифосфатов при их одновременном введении в RCA, что позволяет снизить ингибирующий эффект, но получать большую плотность встраивания флуорофора в растущую цепь ДНК. Подтверждено для RCA ранее обнаруженное в ПЦР влияние длины спейсера на субстратные свойства флуоресцентно-меченных dNTP. Наибольшую плотность встраивания удалось получить при совместном введении в реакцию производных dU и dC с длинным линкером между флуорофором и азотистым основанием.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00257).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 3324–3341. <https://doi.org/10.1039/c3cs60439j>
2. Mori Y., Notomi T. // *J. Infect. Chemother.* 2009. V. 15. P. 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
3. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. // *PLoS Biol.* 2006. V. 4. P. e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
4. Чемисова О.С., Цырулина О.А., Трухачев А.Л., Носков А.К. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022. Т. 99. С. 126–138. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-176>
5. Lapa S.A., Volkova O.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 263–272. <https://doi.org/10.1134/S0132342319040043>
6. Lapa S.A., Guseinov T.O., Pavlov A.S., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 557–562. <https://doi.org/10.31857/S0132342320040168>
7. 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>
8. Shershov V.E., Lapa S.A., Levashova A.I., Shishkin I.Yu., Shtylev G.F., Shekalova E.Yu., Vasiliskov V.A., Zasedatelev A.S., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 1151–1158. <https://doi.org/10.1134/S1068162023050242>
9. Lapa S.A., Volkova O.S., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Mol. Biol.* 2022. V. 56. P. 115–123. <https://doi.org/10.31857/S0026898422010050>
10. Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., Ammur Y.I., Blagodatskikh S.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Mol. Biol.* 2021. V. 55. P. 828–838. <https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>

Comparative Behavior Analysis of Cy5-Pyrimidine Nucleotides in the Rolling Circle Amplification

S. A. Lapa^{*,#}, P. A. Chirkova^{*}, S. A. Surzhikov^{*}, V. E. Kuznetsova^{*},
V. E. Shershov^{*}, and A. V. Chudinov^{*}

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

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

Two pairs of Cy-5-labeled dU and dC triphosphates with similar electroneutral fluorophore structures differing in the length of the hydrocarbon linker between the fluorophore and the nitrogenous base were synthesized. A comparative analysis of their substrate behavior in the rolling circle amplification (RCA) using Bst 3.0 DNA polymerase was carried out. It was found that nucleotides with a long linker between the fluorophore and pyrimidine base are more efficiently incorporated into the growing DNA chain, while nucleotides with a short linker inhibit RCA less. In each of the dU and dC pairs with similar fluorophores and linkers, fluorescently labeled uridine derivatives demonstrated a high embedding density. It was found that with simultaneous incorporation of labeled dU and dC, the inhibitory effect does not summarise. This gives grounds for a more careful study of various Cy5-dC variants in order to increase a sensitivity of the analysis with simultaneous introduction of labeled dU and dC.

Keywords: fluorescently labeled pyrimidine deoxynucleoside triphosphates, rolling circle amplification, DNA labeling

