



УДК 577.113.6

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗОНДЫ ТИПА “МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАЯК” С ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫМ БИФЛУОРОФОРМ¹

© 2021 г. В. А. Брылёв^{*,#}, И. Л. Лысенко^{**}, Е. А. Кокин^{*}, Ю. В. Мартыненко-Макаев^{**}, Д. Ю. Рязанцев^{*}, В. В. Шманай^{**}, В. А. Коршун^{*,***,****}

^{*}ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{**}Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь, 220072 Минск, ул. Сурганова, 13

^{***}Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Россия, 117312 Москва, ул. Вавилова, 7

^{****}Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021 Москва, ул. Б. Пироговская, 11

Поступила в редакцию 19.10.2020 г.

После доработки 26.10.2020 г.

Принята к публикации 31.10.2020 г.

Получено азидопроизводное флуоресцеинового бифлуорофора и использовано для синтеза олигонуклеотидных флуорогенных зондов типа “молекулярный маяк” для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). На основе оптимизированной последовательности синтезированы восемь вариантов зондов: с одним или двумя остатками тушителя на 3'-конце, с одиночной либо бифлуорофорной флуоресцеиновой меткой, присоединенной с помощью модифицирующих фосфамидитов (короткий линкер) или “клик-реакции” (длинный линкер). Сравнение зондов в ПЦР-РВ показало, что зонды с удвоенным тушителем (одиночный флуоресцеин на коротком линкере) и удвоенным красителем на коротком линкере (одиночный тушитель) несколько превосходят по чувствительности стандартный зонд (одиночный тушитель, одиночный краситель на коротком линкере) на величину $\Delta C_t = 1-2$.

Ключевые слова: флуорогенные ДНК-зонды, 5-карбоксихлуоресцеин, 3,5-диаминобензойная кислота, тушение флуоресценции, ПЦР-РВ

DOI: 10.31857/S0132342321030052

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные ДНК-зонды, входящие в состав наборов реагентов для качественной и количественной детекции ДНК и РНК, продолжают оставаться мощным инструментом исследований и средством диагностики [1–4]. Одной из наиболее важных областей применения таких зондов выступает полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) [5]. Данный метод служит для экспресс-детекции и полуколичественного

(по порядку величины) анализа генетического материала; наиболее актуально применение ПЦР-РВ в молекулярной диагностике наследственных патологий, генетически модифицированных организмов, микробных и вирусных патогенов, например, ВИЧ [6] и SARS-CoV-2 [7]. В ПЦР-РВ применяют различные типы флуорогенных ДНК-зондов, способных к усилению флуоресценции при взаимодействии с накапливающимся ПЦР-продуктом; флуорогенный эффект достигается в результате взаимодействия двух красителей, один из которых может быть нефлуоресцентным (тушителем) [5, 8]. Для флуорогенных зондов изучается взаимосвязь типа красителя и структуры зонда [9], разрабатываются новые красители [10–12], исследуются зонды с двумя остатками флуоресцентного красителя и/или тушителя флуоресценции [13–15]. Наиболее популярным красителем для ДНК-зондов остается флуоресцеин, присоединяемый в виде карбоксильного производного по аминогруппе того или

¹ Дополнительные материалы к статье доступны по doi 10.31857/S0132342321030052 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ВНQ1 – 4'-(2-нитро-4-толилдиазо)-2'-метокси-5'-метилазобензол-4-диалкиламин (тушитель флуоресценции); DMAP – 4-диметиламинопиридин; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; 5-FAM – 5-карбоксихлуоресцеин амид; HOBT – 1-гидроксисбензотриазол.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 724-67-15; эл. почта: v.brylev@yandex.ru).

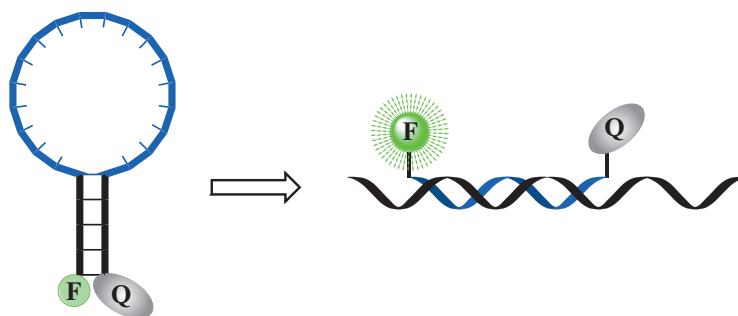


Рис. 1. Принцип действия флуорогенного ДНК-зонда “молекулярный маяк”. F – флуоресцентный краситель, Q – тушитель.

иногo линкера; такой флуоресцеинамид обозначают аббревиатурой FAM. Введение в биоконъюгат нескольких остатков флуоресцеина может привести к значительному самотушению флуоресценции [16]; с другой стороны, прикрепление флуоресцеинов с помощью жесткого линкера предотвращает самотушение [17]. Ранее мы получили FAM-бифлуорофоры на основе 3,5-диаминобензойной кислоты [18, 19]. Целью данной работы стало исследование FAM-бифлуорофора на различных линкерах в сравнении с одиночной флуоресцеиновой меткой в составе флуорогенных олигонуклеотидных зондов типа “молекулярный маяк” для ПЦР-РВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДНК-зонды типа “молекулярный маяк” (рис. 1) представляют собой олигонуклеотид, несущий на 5'- и 3'-концах флуоресцентный краситель (F) и тушитель (Q), причем 5'- и 3'-концевые области зонда (5–7 нуклеотидов) комплементарны. В результате в водном растворе при комнатной температуре зонд существует преимущественно в виде шпильчатой структуры, состоящей из стебля и петли, причем флуорофор и тушитель сближены. Петлевая часть “молекулярного маяка” комплементарна целевой последовательности – мишени (в ПЦР-РВ – продукт ПЦР), и в результате гибридизации с ней шпилька разрушается, красители разобщаются, и происходит разгорание флуоресценции (рис. 1). Мониторинг интенсивности флуоресценции проводят на каждом цикле ПЦР, регистрируя в результате зависимость эмиссии от числа циклов ПЦР.

В данной работе был использован оптимизированный шпильчатый зонд, комплементарный участку амплифицируемого фрагмента гена фактора трансляции 1 α гриба *Fusarium avenaceum* [14]. Нуклеотидная последовательность зонда, структуры его химических модификаций и подходы к синтезу 5-FAM-бифлуорофорных зондов приведены на рис. 2. Зонды **MB3** и **MB4** (табл. 1) синтезировали с использованием фосфорамидитного

реагента (**I**) [18]. В данной работе получен азидный реагент (**V**) на основе 5-FAM-бифлуорофора для мечения алкин-модифицированных олигонуклеотидов с помощью Cu(I)-катализируемой реакции циклоприсоединения (“клик-реакция”). Исходную 3,5-ди(трифторацетиламино)бензойную кислоту (**II**) [20] конденсировали с 3-азидпропиламином [21] с последующим деблокированием аминогрупп аммиаком. Полученный диамин (**III**) ацилировали пентафторфениловым эфиром дипивалоил-защищенного 5-карбокси-флуоресцеина (**IV**) [22]. Удаление пивалоильных защитных групп привело к образованию азидного производного 5-FAM-бифлуорофора (**V**). Последний использовали для модификации алкиновых олигонуклеотидов в растворе с помощью “клик-реакции”; таким образом получены зонды **MB7** и **MB8** (табл. 1). Зонды с одиночным флуоресцеином получали с помощью 5-FAM-фосфамидита [22] (**MB1** и **MB2**) или “клик”-модификацией алкиновых олигонуклеотидов 5-FAM-азидным реагентом [23] (**MB5** и **MB6**) (табл. 1). Терминальный алкин вводили в олигонуклеотиды с помощью фосфамидитного реагента [24]. Удвоенный тушитель ВНQ1 (Q₂) вводили в олигонуклеотиды, как описано ранее [13]. Все компоненты зондов представлены на рис. 2. На 3'-конце располагается один или два тушителя ВНQ1 (Q), а на 5'-конце могут находиться один или два флуорофора (5-FAM), присоединенные с помощью фосфамидитов или “клик-реакции” с азидными реагентами.

При нагревании шпильчатых зондов в растворе происходит “плавление” стебля, сопровождающееся разгоранием флуоресценции. По максимуму первой производной функции зависимости интенсивности флуоресценции от температуры можно определить температуру плавления зонда (табл. 1). Видно, что структура модификации 5'-концевой области (линкер и число остатков 5-FAM) практически не влияет на температуру плавления зонда. Напротив, введение дополнительного остатка тушителя ВНQ1 (Q) в 3'-конце-

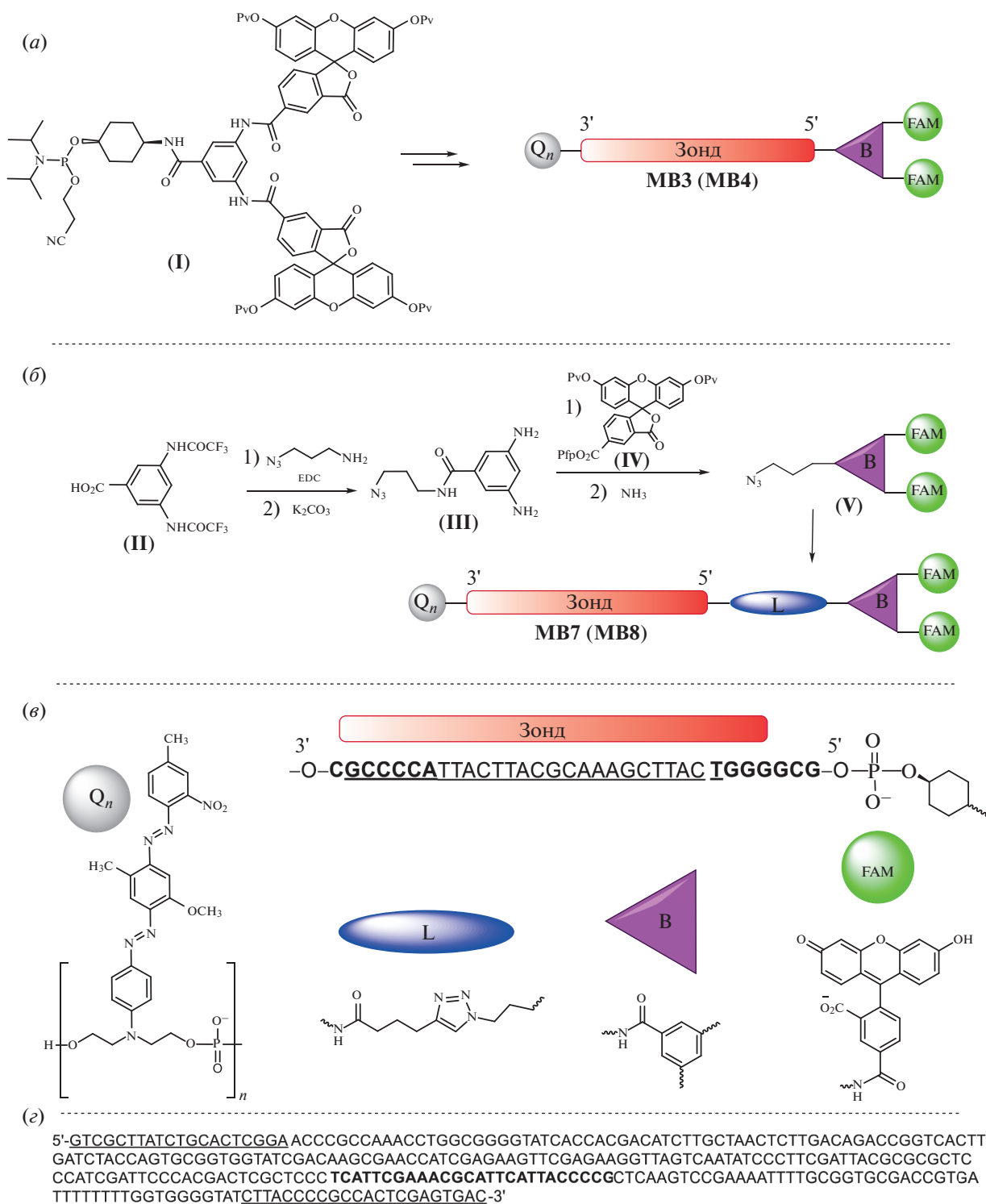


Рис. 2. Синтез олигонуклеотидных зондов с 5-FAM-бифлуорофором. Pv – пивалоил, Pfr – пентафторфенил, FAM – 5-FAM-флуорофор. (a) – Схема синтеза зондов **MB3** и **MB4** амидофосфитным способом; (б) – синтез азидопроизводного (V) и зондов **MB7** и **MB8**; (в) – основные компоненты зонда, Q – тушитель, L – линкер, B – разветвляющий фрагмент на основе 3,5-диаминобензойной кислоты. Подчеркнута последовательность зонда, комплементарная мишени; жирным выделены фрагменты, образующие стебель шпильки; (е) – детектируемая последовательность фрагмента гена, кодирующего фактор элонгации трансляции 1 α длиной 290 п.н. из *Fusarium avenaceum*. Подчеркнуты участки, комплементарные праймерам Fat65R и Fat65F; жирным выделен участок гена, связывающийся с зондами **MB1**–**MB8**.

Таблица 1. Основные характеристики флуорогенных зондов для ПЦР-РВ

Схема зонда, 3'→5'	Шифр	n	Плавление флуоресцентного зонда		ПЦР-РВ			
			T _{пл} , °C	SBR	детекция при 55°C		детекция при 64°C	
					относительная фоновая флуоресценция, I _{0MBi} /I _{0MB1}	относительное усиление флуоресценции, I _{ГМВи} /I _{0МВи}		относительная фоновая флуоресценция, I _{0МВи} /I _{0МВи1}
	MB1	1	65.3	10.4	1.00	2.69	1.00	1.35
	MB2	2	70.9	11.3	0.74	2.97	0.89	1.63
	MB3	1	65.6	21.6	1.31	3.17	1.17	1.72
	MB4	2	71.8	7.7	1.31	1.49	0.75	1.21
	MB5	1	66.9	8.5	0.94	2.32	0.92	1.30
	MB6	2	68.5	9.1	0.88	2.07	0.52	1.40
	MB7	1	66.6	3.0	2.91	1.26	—	—
	MB8	2	73.3	4.6	0.95	1.60	0.57	1.26

Примечание: температуры плавления зондов (T_{пл}) определяли с использованием нагревания в термоциклере (20°C→95°C, см. “Эксперим. часть”) как значение в точке максимума первой производной. Значения отношения сигнал/фон (SBR) рассчитаны, как описано в “Эксперим. часть”. I_{0МВи} – начальная (фоновая) интенсивность флуоресценции зондов MB1–MB8; I_{ГМВи} – конечная (плато) интенсивность флуоресценции зондов MB1–MB8; значения рассчитаны на основе экспериментов ПЦР-РВ (условия см. в “Эксперим. часть”). Все значения приведены как средние величины параметров, полученных в трех повторах каждого эксперимента. Прочерк – данные отсутствуют. Q_n – тушитель (один или два – см. значение n), L – линкер, B – разветвляющийся фрагмент на основе 3,5-диаминобензойной кислоты.

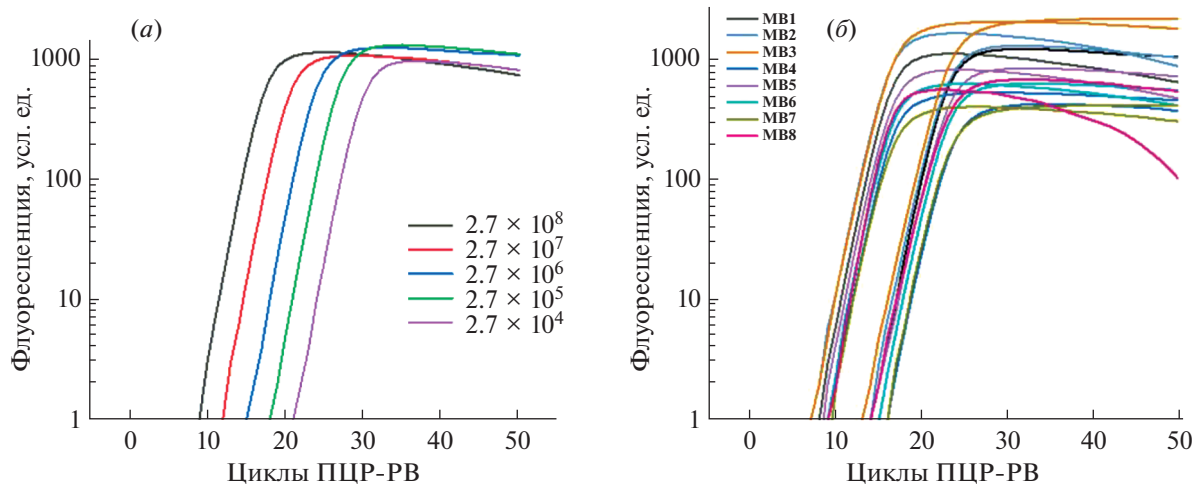


Рис. 3. Профили разгорания флуоресценции в количественной ПЦР-РВ; детекция флуоресценции при 55°C. (а) – Детекция различного количества молекул мишени с помощью зонда **MB1**; (б) – сравнение зондов **MB1–MB8** в ПЦР-РВ с 2.7×10^7 (слева) и 2.7×10^8 молекул мишени (справа).

вую область увеличивает температуру плавления шпильки на 4–5°C, что согласуется с ранее опубликованными данными [14]. Для разгорания флуоресценции зондов при плавлении сложно выделить какие-то закономерности, можно лишь отметить, что зонды с короткими линкерами дают большее увеличение интенсивности эмиссии (табл. 1).

В условиях ПЦР-РВ при накоплении ПЦР-продукта все большая доля зонда образует с ним дуплекс, и при нагревании происходит плавление комплекса зонд–мишень. Поэтому было также изучено изменение флуоресценции при плавлении дуплекса зонда с мишенью (см. дополнительные материалы к публикации). При плавлении как шпильки, так и дуплекса с мишенью наилучшую кооперативность плавления показал зонд **MB2** с двумя тушителями.

Далее зонды сравнивали в условиях ПЦР-РВ, причем детекцию флуоресценции в каждом цикле проводили при двух температурах (55 и 64°C). Были получены значения относительной фоновой флуоресценции по сравнению с контрольным зондом **MB1**, а также относительное усиление флуоресценции в конечной точке ПЦР по сравнению с исходной флуоресценцией зонда (табл. 1). Видно, что дополнительный остаток тушителя во всех случаях приводит к некоторому уменьшению исходной (фоновой) флуоресценции (табл. 1), но снижает конечное разгорание эмиссии в случае зондов **MB4** и **MB6** (рис. 3б).

Для проверки применимости зондов для количественной детекции генетического материала использовали серию 10-кратных разведений мишени. Зонд **MB1** позволяет детектировать мишень в диапазоне 50 зептомоль – 0.5 фемтомоль (рис. 3а). Наилучшую чувствительность проде-

монстрировали зонды **MB2** (удвоенный тушитель и единичный остаток 5-FAM на коротком линкере) и **MB3** (единичный тушитель и FAM-бифлуорофор на коротком линкере) – они разгорались примерно на один цикл раньше, чем стандартный зонд **MB1**. Остальные зонды по чувствительности уступали **MB1** (рис. 3б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители и реагенты использовали без дополнительной очистки. 3-Азидопропиламин [21], а также соединения (**II**) и (**IV**) синтезировали, как описано ранее [20, 22]. ^1H - и ^{13}C -спектры ЯМР были получены на ЯМР-спектрометре DRX-500 (500 МГц; Bruker, Германия) с отношением сигналов по пикам остаточных протонов в $\text{DMSO}-d_6$ (2.50 м.д. для ^1H и 39.52 м.д. для ^{13}C). КССВ приведены в герцах (Гц) для соответствующих мультиплетов. Тонкослойную хроматографию выполняли на алюминиевых пластинах TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия).

3-Азидопропил-3,5-бис(3',6'-дигидрокси-3-оксо-3Н-спиро(изобензо-фуран-1,9'-ксантен)-5-ил-карбоксамидо)бензоат (V). К раствору кислоты (**II**) (2.00 г, 5.8 ммоль) в ДМФА (15 мл) добавляли 3-азидопропиламин (700 мг, 6.9 ммоль), EDC·HCl (1.67 г, 8.7 ммоль), HOBT (1.18 г, 8.7 ммоль), Et_3N (2.42 мл, 17.4 ммоль) и перемешивали 12 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона. Разбавляли AcOEt (50 мл), промывали водой (2 × 30 мл), 10%-ным раствором лимонной кислоты (3 × 30 мл), 5%-ным раствором NaHCO_3 (3 × 30 мл), насыщенным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали, остаток перекристаллизовывали из метилхлорида. Получили 3-азидо-

пропиламид 3,5-ди(трифторацетиламино)бензойной кислоты (2.00 г, 81%) в виде белого порошка. R_f 0.6 (метанол–дихлорметан 5 : 95 (v/v)). Спектр для промежуточного соединения (II) ^1H -ЯМР (DMSO- d_6), δ , м.д.: 11.54 (с, 2H), 8.62 (т, J 5.6, 1H), 8.24 (т, J 2.0, 1H), 7.94 (д, J 2.0, 2H), 3.41 (т, J 6.8, 2H), 1.78 (квинтет, J 6.8, 2H).

К раствору бистрифторацетамида (II) (500 мг, 1.2 ммоль) в метаноле (15 мл) добавляли K_2CO_3 (842 мг, 6.1 ммоль), воду (4 мл) и перемешивали 1.5 ч при кипячении в атмосфере аргона. Упаривали досуха, упаривали с ацетонитрилом (4 \times 20 мл), растворяли в AcOEt (30 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. Получили соединение (III) в виде желтоватого масла, которое далее использовали без дополнительной очистки и характеристики. R_f 0.32 (метанол–дихлорметан 1 : 9 (v/v)).

Соединение (III) растворяли в DMF (20 мл), добавляли DMAP (428 мг, 3.5 ммоль), Et_3N (488 мкл, 3.5 ммоль), пентафторфениловый эфир пивалат-защищенного карбоксифлуоресцеина (IV) (2.08 г, 2.9 ммоль) и перемешивали 7 сут при 50°C в атмосфере аргона. Затем реакционную смесь упаривали досуха, разбавляли AcOEt (50 мл), промывали водой (2 \times 30 мл), 10%-ной лимонной кислотой (2 \times 30 мл), 5%-ным раствором NaHCO_3 (3 \times 30 мл), насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , упаривали, остаток хроматографировали на силикагеле в системе дихлорметан/ацетон (100 : 0 \rightarrow 75 : 25 (v/v)). Целевые фракции объединяли, упаривали, остаток растворяли в ацетоне (15 мл), добавляли 25%-ный водный раствор аммиака (2 мл), перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Избыток аммиака и ацетон упаривали, раствор разбавляли до 10 мл водой и добавляли 10%-ный раствор HCl до pH 2; осадок фильтровали, промывали водой. Перекристаллизовывали из смеси метанол–ацетонитрил (1 : 9 (v/v)). Получили соединение (V) в виде желтоватого порошка (645 мг, 58%). R_f 0.7 (метанол–этилацетат 1 : 3 (v/v)). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6), δ , м.д.: 10.82 (с, 2H), 8.69–8.65 (м, 2H), 8.62–8.57 (м, 2H), 8.40 (дд, J 8.1, 1.7, 2H), 8.02 (д, J 1.9, 2H), 7.47 (д, J 8.1, 2H), 6.75 (д, J 2.3, 2H), 6.64 (д, J 8.7, 4H), 6.62–6.58 (м, 4H), 3.44 (т, J 6.8, 2H), 3.36 (кварт, J 6.4, 2H), 1.82 (квинтет, J 6.8, 2H). Спектр ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6), δC , м.д.: 168.15, 166.62, 164.12, 159.91, 154.93, 151.97, 139.14, 136.42, 135.96, 135.23, 129.22, 126.61, 124.55, 124.11, 115.56, 115.46, 112.90, 109.14, 102.40, 48.62, 36.83, 28.47.

Количественную ПЦР-РВ проводили на детектирующем амплификаторе ДТпрайм (ДНК-технология, Россия) с использованием пары праймеров Fat65R–Fat65F и плазмиды rTZ-Fat, содержащей фрагмент гена, кодирующего фактор элонгации трансляции 1 α длиной 290 п.н. из *Fusarium avenaceum* (рис. 2з).

Реакционная смесь (35 мкл) содержала 83.75 мМ Трис- HCl , 20.75 мМ сульфат аммония, 3.125 мМ хлорид магния, 0.003% Tween-20, 0.003% NP-40, 6.25% глицерина, 0.17 мМ каждого dNTP, 0.36 мкМ праймеров, 0.2 мкМ каждого зонда из набора **MB1–MB8**, 2.5 МЕ Taq-полимеразы и ДНК-матрицу (плазида rTZ-Fat, 2.7×10^4 – 2.7×10^8 копий), pH 8.8. Эксперименты повторяли трижды и анализировали геометрическим методом (C_q) с использованием программного обеспечения Real-time PCR 7.9 (ДНК-технология, Россия). Учитывали фоновую флуоресценцию каждой лунки с образцом. Для количественной детекции разных концентраций матрицы зондом **MB1** соблюдалась прямая зависимость количества циклов от содержания матрицы в образце, а величина $R^2 \geq 0.99$. Для количественной ПЦР использовали раствор матрицы с заранее определенной концентрацией (спектрофотометрически при длине волны 260 нм). Из этого раствора отбирали аликвоты и последующим разведением получали образцы с известным количеством молекул мишени. Программа ПЦР-РВ: 80°C – 60 с; 94°C – 90 с (1 цикл); затем 94°C – 30 с, 64°C – 15 с (5 циклов) и 94°C – 10 с, 64°C – 15 с (45 циклов) (флуоресценцию регистрировали при 55 или 64°C с помощью детектора в FAM-канале).

Эксперименты по плавлению зондов MB1–MB8 проводили в трех повторах на том же приборе (канал обнаружения FAM) с каждым зондом из ряда **MB1–MB8** по отдельности в буфере для ПЦР без dNTP, праймеров, Taq-полимеразы и плазмидной матрицы. Концентрация каждого зонда составляла 0.2 мкМ. Температуру повышали с 20 до 95°C с шагом 0.5°C в 15 с. Для каждого шага измеряли уровень флуоресценции. Дуплексы MB_i /мишень предварительно отжигали с двукратным избытком короткой 26-мерной комплементарной последовательности и плавляли в тех же условиях. Затем строили график зависимости интенсивности флуоресценции от температуры в диапазоне 20–95°C. Температуры плавления рассчитывали как максимумы первой производной с использованием программы OriginPro 8. Отношение сигнал/фон (SBR) для зондов **MB1–MB8** рассчитывали по формуле:

$$\text{SBR} = (I_{\text{fMB}_i} - I_0) / (I_{\text{oMB}_i} - I_0),$$

где I_0 – флуоресцентный шумовой сигнал образца для ПЦР, содержащего все компоненты, но без зонда; MB_i – испытуемый зонд из набора **MB1–MB8**; I_{oMB_i} – флуоресценция MB_i в отсутствие матрицы; I_{fMB_i} – флуоресцентный сигнал предварительно гибридного MB_i с короткой комплементарной 26-мерной последовательностью 5'-CGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGA-3'. Измерения I_0 , I_{oMB_i} , I_{fMB_i} проводили при 20°C в детектирующем амплификаторе ДТпрайм (ДНК-

технология, Россия) с 0.2 мкМ МВ₁ и двукратным избытком комплементарного олигонуклеотида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была исследована эффективность FAM-бифлуорофора на основе 3,5-диаминобензойной кислоты на различных линкерах в сравнении с одиночной флуоресцеиновой меткой в составе флуорогенных олигонуклеотидных зондов типа “молекулярный маяк” для ПЦР-РВ. Показано, для таких шпилечных ПЦР-РВ-зондов предпочтительно присоединение флуоресцеина (как одиночной метки, так и бифлуорофора) через короткий линкер с помощью амидофосфитных реагентов. Наибольшая чувствительность зонда в ПЦР-РВ достигается при введении нестандартных модификаций – удвоенного тушителя либо удвоенного красителя, но не обеих модификаций одновременно.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-54-04111, В.А. Брылёв) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант М17РМ-047, Ю.В. Мартыненко-Макаев).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vilaivan T. // *Beil. J. Org. Chem.* 2018. V. 14. P. 253–281. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.17>
2. Chen J., Shi C., Kang X., Shen X., Lao X., Zheng H. // *Anal. Meth.* 2020. V. 12. P. 884–893. <https://doi.org/10.1039/c9ay02332a>
3. Michel B.Y., Dziuba D., Benhida R., Demchenko A.P., Burger A. // *Front. Chem.* 2020. V. 8. P. 112. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00112>
4. Quan K., Yi C., Yang X., He X., Huang J., Wang K. // *Tr. Anal. Chem.* 2020. V. 124. P. 115784. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115784>
5. Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M.J., Solera J. // *Clin. Chim. Acta.* 2015. V. 439. P. 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
6. Farzan V.M., Kvach M.V., Aparin I.O., Kireev D.E., Prizkazhikova T.A., Ustinov A.V., Shmanai V.V., Shipulin G.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Talanta.* 2019. V. 194. P. 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.043>
7. Vogels C.B.F., Brito A.F., Wyllie A.L., Fauver J.R., Ott I.M., Kalinich C.C., Petrone M.E., Casanovas-Massana A., Muenker M.C., Moore A.J., Klein J., Lu P., Lu-Culligan A., Jiang X., Kim D.J., Kudo E., Mao T., Moriyama M., Oh J.E., Park A., Silva J., Song E., Takahashi T., Taura M., Tokuyama M., Venkataraman A., Weizman O.-E., Wong P., Yang Y., Cheemarla N.R., White E.B., Lapidus S., Earnest R., Geng B., Vijayakumar P., Odio C., Fournier J., Bermejo S., Farhadian S., Dela Cruz C.S., Iwasaki A., Ko A.I., Landry M.L., Foxman E.F., Grubaugh N.D. // *Nature Microbiol.* 2020. V. 5. P. 1299–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
8. Ranasinghe R.T., Brown T. // *Chem. Commun.* 2005. P. 5487–5502. <https://doi.org/10.1039/b509522k>
9. Farzan V.M., Aparin I.O., Veselova O.A., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Anal. Meth.* 2016. V. 8. P. 5826–5831. <https://doi.org/10.1039/c6ay01304j>
10. Aparin I.O., Farzan V.M., Veselova O.A., Chistov A.A., Podkolzin A.T., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Formanovsky A.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Analyst.* 2016. V. 141. P. 1331–1338. <https://doi.org/10.1039/c5an01767j>
11. Натыров А.Н., Власова Н.А., Матвиенко И.В., Волков Е.М., Байрамов В.М., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И. // *Биоорг. химия.* 2018. Т. 44. С. 570–580. [Natyrov A.N., Matvienko I.V., Bayramov V.M., Alexeev J.I., Vlasova N.A., Volkov E.M., Kurochkin V. E. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 562–571.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018040131>
12. Матвиенко И.В., Байрамов В.М., Парыгина Н.А., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 310–321. [Matvienko I.V., Bayramov V.M., Parygina N.A., Kurochkin V.E., Alexeev Y.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 349–359.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020030127>
13. Ryazantsev D.Y., Tsybulsky D.A., Prokhorenko I.A., Kvach M.V., Martynenko Y.V., Philipchenko P.M., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zavriev S.K. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 404. P. 59–68. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6114-4>
14. Ryazantsev D.Y., Kvach M.V., Tsybulsky D.A., Prokhorenko I.A., Stepanova I.A., Martynenko Y.V., Gontarev S.V., Shmanai V.V., Zavriev S.K., Korshun V.A. // *Analyst.* 2014. V. 139. P. 2867–2872. <https://doi.org/10.1039/c4an00081a>
15. Tsybulsky D.A., Kvach M.V., Ryazantsev D.Y., Aparin I.O., Stakheev A.A., Prokhorenko I.A., Martynenko Y.V., Gontarev S.V., Formanovsky A.A., Zatsepin T.S., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zavriev S.K. // *Mol. Cell. Probes.* 2016. V. 30. P. 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.10.003>
16. Haralambidis J., Angus K., Pownall S., Duncan L., Chai M., Tregear G.W. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 501–505. <https://doi.org/10.1093/nar/18.3.501>
17. Martin V.V., Alferiev I.S., Weis A.L. // *Tetrahedron Lett.* 1999. V. 40. P. 223–226. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)02280-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)02280-1)
18. Мартыненко-Макаев Ю.В., Брылёв В.А., Удодова В.В. // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* 2017. Т. 3. С. 72–78.

19. *Povedailo V.A., Lysenko I.L., Tikhomirov S.A., Yakovlev D.L., Tsybulsky D.A., Kruhlik A.S., Fan F., Martynenko-Makaev Y.V., Sharko O.L., Duong P.V., Minh P.H., Shmanai V.V.* // *J. Fluoresc.* 2020. V. 30. P. 629–635. <https://doi.org/10.1007/s10895-020-02535-w>
20. *Washio I., Shibasaki Y., Ueda M.* // *Org. Lett.* 2007. V. 9. P. 1363–1366. <https://doi.org/10.1021/ol0702425>
21. *Knör S., Modlinger A., Poethko T., Schottelius M., Wester H.-J., Kessler H.* // *Chem. Eur. J.* 2007. V. 13. P. 6082–6090. <https://doi.org/10.1002/chem.200700231>
22. *Kvach M.V., Tsybulsky D.A., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Bondarev S.L., Gontarev S.V., Korshun V.A., Shmanai V.V.* // *Bioconjugate Chem.* 2007. V. 18. P. 1691–1696. <https://doi.org/10.1021/bc7001874>
23. *Wang Q., Chan T.R., Hilgraf R., Fokin V.V., Sharpless K.B., Finn M.G.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 3192–3193. <https://doi.org/10.1021/ja021381e>
24. *Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., Brylev V.A., Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S.* // *Bioconjugate Chem.* 2017. V. 28. P. 2599–2607. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00462>

Molecular Beacon DNA Probes with Fluorescein Bifluorophore

V. A. Brylev*^{#,}, I. L. Lysenko**, E. A. Kokin*, Y. V. Martynenko-Makaev**, D. Y. Ryazantsev*, V. V. Shmanai**, and V. A. Korshun*^{***, ****}

[#]Phone: +7(499)724-67-15; e-mail: v.brylev@yandex.ru

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

***Institute of Physical Organic Chemistry of NAS Belarus, ul. Surganova 13, Minsk, 220072 Belarus*

****Department of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, ul. Vavilova 7, Moscow, 117312 Russia*

*****Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119021 Russia*

There was obtained azido-derivative of a fluorescein bifluorophore. It was used for the synthesis of “molecular beacon”-type oligonucleotide fluorogenic probes for RT-PCR. There were obtained 8 probe variants based on the optimized sequence: with one or two quencher residues at the 3'-end, with a single or bifluorophore fluorescein label attached to 5'-end using modifying phosphoramidites (short linker) or “click reaction” (long linker). Comparison of probes in RT-PCR showed that probes with a doubled quencher (single fluorescein on a short linker) and doubled dye on a short linker (single dye) are somewhat superior in sensitivity to a standard probe (single quencher, single dye on a short linker) by the value of $\Delta C_t = 1-2$.

Keywords: fluorogenic DNA probes, 5-carboxyfluorescein, 3,5-diaminobenzoic acid, fluorescence quenching, real-time qPCR