

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

На правах рукописи

Апарин Илья Олегович

**Азидопроизводные красителей и ненуклеозидные реагенты на основе
хиральных 1,3-диолов для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов**

Специальность 02.00.10 - биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
д.х.н. Андрей Альфредович Формановский

Москва - 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ДНК-ЗОНДЫ	7
1.1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ДИЗАЙНА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ	7
1.1.1. <i>Неприродные модификации основной цепи зонда</i>	9
1.1.2. <i>Ненуклеозидные суррогаты для модификации олигонуклеотидной цепи</i>	10
1.1.3. <i>Флуоресцентные маркеры</i>	12
1.1.4. <i>FRET (Förster resonance energy transfer) в олигонуклеотидных зондах</i>	15
1.1.5. <i>Тушители флуоресценции</i>	17
1.1.6. <i>Эксимерные и эксиплексные системы</i>	20
1.2. ЗОНДЫ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ <i>IN SITU</i> (FISH)	22
1.2.1. <i>Полинуклеотидные зонды</i>	22
1.2.2. <i>Олигонуклеотидные зонды</i>	23
1.2.3. <i>Непрямые способы мечения</i>	23
1.2.4. <i>CARD-FISH</i>	24
1.2.5. <i>RCA-FISH</i>	25
1.2.6. <i>bDNA-FISH и FISH-STICs</i>	25
1.2.7. <i>HCR-FISH</i>	28
1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ	30
1.3.1. <i>Молекулярные маяки</i>	30
1.3.1.1. <i>Классические молекулярные маяки</i>	30
1.3.1.2. <i>Молекулярные маяки с несколькими флуорофорами и тушителями</i>	31
1.3.1.3. <i>Молекулярные маяки с переносом энергии</i>	35
1.3.1.4. <i>Эксимерные молекулярные маяки</i>	37
1.3.1.5. <i>Конъюгаты молекулярных маяков с проникающими пептидами</i>	41
1.3.2. <i>Смежные зонды</i>	42
1.3.2.1. <i>Смежные зонды с переносом энергии</i>	42
1.3.2.2. <i>Смежные зонды с тремя флуорофорами</i>	43
1.3.2.3. <i>Эксимерные смежные зонды</i>	43
1.3.2.4. <i>Смежные зонды со структурой молекулярных маяков</i>	44
1.3.2.5. <i>Смежные зонды для времяразрешенной детекции люминесцентного сигнала</i>	45
1.3.2.6. <i>Зонды с матричным лигированием</i>	49
1.3.2.7. <i>Матричная активация флуорофора в составе смежных зондов</i>	53
1.3.3. <i>TaqMan зонды</i>	58
1.3.4. <i>Прочие зонды для кПЦР</i>	60
1.3.4.1. <i>Шпильчатые зонды-праймеры</i>	60
1.3.4.2. <i>Цикликоны</i>	61
1.3.4.3. <i>AnglerTM</i>	61
1.3.4.4. <i>ResonSenseTM</i>	61
1.3.4.5. <i>HyBeaconTM</i>	61
1.3.5. <i>Инь-Янь зонды</i>	62

1.3.6. Зонды с интеркалирующими красителями (без тушителя)	63
1.3.6.1. Последовательность-чувствительные зонды на основе ПАУ	63
1.3.6.2. Зонды с тиазоловым оранжевым	67
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	
МОНОМЕРЫ НА ОСНОВЕ D-(-)-ПАНТОЛАКТОНА И АЗИДОПРОИЗВОДНЫЕ ДЛЯ МЕЧЕНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	69
2.1 ЭКСИМЕРНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАЯКИ	69
2.1.1 Синтез мономеров на основе D-(-)-пантолактона для мечения молекулярных маяков.	70
2.1.2. Синтез молекулярных маяков, меченных пиреновыми флуорофорами и тушителем Dabcyl	73
2.1.3. Изучение фотофизических свойств полученных зондов.	75
2.1.4. Молекулярное моделирование стабильности эксимерных флуорофоров	77
2.1.5. Пиреновый эксимер в качестве FRET-донора в олигонуклеотидных зондах.	79
2.1.6. Изучение резонансного переноса между эксимером и сульфо-Су3 при расположении на олигонуклеотидной матрице. Оптимизация структуры зондов.	81
2.1.7. Определение эффективности FRET от пиренового эксимера к сульфо-Су3	89
2.2. СИНТЕЗ АЗИДОПРОИЗВОДНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ДНК-ЗОНДОВ	93
2.2.1. Библиотека функциональных азидопроизводных для твердофазного мечения олигонуклеотидов	93
2.2.2. Применение функциональных азидопроизводных для твердофазной модификации олигонуклеотидов	96
2.2.3. PEру – новый маркер для кПЦР	98
2.2.3.1. Модификация олигонуклеотидных зондов.	99
2.2.3.2. Изучение флуоресценции PEру в олигонуклеотидных зондах	99
2.2.3.3. Сравнение PEру с аминокумаринами в качестве флуоресцентных меток зондов для кПЦР	103
2.3. КОНЬЮГАЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ	106
2.3.1. Синтез реагентов для конъюгации иммуноглобулинов с олигонуклеотидами.	107
2.3.2. Мечение моноклонального антитела кросс-сшивающим реагентом на основе сульфо-Су5	110
2.3.3. Конъюгация меченых антител с олигонуклеотидами	113
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	118
ВЫВОДЫ	151
БЛАГОДАРНОСТИ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	153
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	155
ПРИЛОЖЕНИЯ	177

Введение

На настоящий момент трудно переоценить значение методов, использующих гибридационные зонды для нуклеиновых кислот (НК). Анализ последовательностей НК-зондами давно стал рутинным методом в медицинской диагностике, геномике, агрохимии, вирусологии, молекулярной и клеточной биологии. Современными технологиями с применением флуоресцентных ДНК-зондов являются полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (qPCR, кПЦР), флуоресцентный вариант Саузерн-блоттинга для ДНК и нозерн-блоттинга для мРНК, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), анализ с помощью ДНК-микрочипов и визуализация специфических РНК в живой клетке. Самый распространенный способ детекции НК-мишеней – регистрация сигнала флуоресценции при гибридизации ДНК-зонда с комплементарной ему последовательностью. Это обусловлено чувствительностью и универсальностью метода. За последние два десятилетия было предложено множество архитектур олигонуклеотидных зондов: молекулярные маяки, смежные зонды, Инь-Янь зонды, TaqMan (и прочие зонды для кПЦР) и т.д.

Колоссальное разнообразие методов в химии синтетических олигонуклеотидов, их доступность и новые принципы дизайна флуоресцентных ДНК-зондов значительно расширили спектр применений последних. Развитие твердофазного синтеза олигонуклеотидов и методов их эффективной и мягкой конъюгации увеличивают возможности синтеза модифицированных ДНК-зондов. Химический синтез и модификация нуклеиновых кислот позволили упростить и удешевить процедуру получения зондов в сравнении с ферментативными методами. Отработка надежных подходов для введения флуоресцентных маркеров, как в самом твердофазном синтезе, так и пост-синтетически, расширила возможности гибридационных методов анализа и уменьшила значение ферментативных методов мечения и радиоизотопных меток.

Непрямые варианты мечения в FISH и полинуклеотидные зонды на основе ПЦР-продуктов устаревают из-за своей громоздкости, слабой чувствительности и времязатратности. Кроме того, трудоемкий FISH-анализ в ряде случаев вытеснила визуализация *in vivo* благодаря системам доставки олигонуклеотидных зондов внутрь живых клеток. Для амплификации флуоресценции были разработаны многочисленные способы каскадного усиления сигнала. Ранние подходы заключались в активации флуоресцентного или окрашенного субстрата при помощи ферментативного маркера зонда. Однако нечеткость покрашенной области и проблемы с внутриклеточной пермеабиллизацией

ферментативно-меченных зондов привели к необходимости искать иные способы амплификации.

Первая часть данной работы посвящена дизайну и оптимизации пиренового эксимера как флуоресцентного маркера олигонуклеотидных зондов. При помощи новых реагентов была оптимизирована структура пиренового эксимера с улучшением его фотофизических характеристик. Был разработан новый нуклеозидный каркас исходя из дешевого хирального D-пантолактона и получены реагенты для олигонуклеотидного синтеза. На основе модифицирующих мономеров был синтезирован ряд эксимерных молекулярных маяков и выявлены закономерности в оптимизации комплексной пиреновой метки.

Полоса испускания пиренового эксимера смещена на 120–150 нм относительно возбуждения пирена. Тем не менее, яркость флуоресценции эксимера всегда уступает классическим флуоресцентным меткам, например, ксантоновым и цианиновым красителям. Мы разработали способ увеличения Стоксова сдвига вплоть до 220 нм, используя пиреновый эксимер в качестве донора совместно с акцепторным флуорофором сульфо-Су3. FRET пара эксимер/Су3 показала чрезвычайно высокую эффективность. Была проведена детальная оптимизация структуры смежных зондов и изучен перенос энергии для этой неклассической донорно-акцепторной пары флуорофоров.

Реакция медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (Cu(I)AAC) в настоящее время является наиболее популярным методом модификации олигонуклеотидных зондов. Вторая часть исследования связана с отработкой условия Cu(I)AAC для введения азидопроизводных нуклеотидных меток в ДНК-зонды. Была получена библиотека функциональных азидов и на их основе отработаны условия «клик»-реакции с алкин-модифицированными олигонуклеотидами до удаления с твердого носителя; подобраны оптимальные условия и катализатор для проведения реакции.

Несколько азидопроизводных флуорофоров с испусканием в голубой области использовались в качестве маркеров ДНК-зондов для мультиплексной кПЦР. Стандартные кумариновые флуорофоры для «голубого» (коротковолнового) канала флуоресценции значительно уступают в яркости красителям для других каналов, тем самым снижая чувствительность и предел обнаружения числа копий НК. В данной работе предлагается использовать полиароматический фенилэтинилпиреновый флуорофор (PERy) как альтернативу кумариновым красителям. Зонды, несущие PERy маркер, показали лучшие фотофизические характеристики и результаты в кПЦР: увеличение флуоресцентного сигнала и пониженные значения порогового цикла ПЦР в сравнении с

коммерчески доступными 7-аминокумарином (AMCA) и его сульфированным производным Alexa Fluor 350.

Отдельный этап исследования посвящен методу создания ковалентного конъюгата флуоресцентных олигонуклеотидов с иммуноглобулином. Для этого был использован «безмедный» вариант азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC) с участием циклооктинового производного ADIBO в составе олигонуклеотида. Также синтезирован кросс-сшивающий линкер на основе цианинового красителя сульфо-Cy5, содержащий азидогруппу и активированный NHS эфир. Реагент позволил отработать условия контролируемого введения азидогрупп в молекулу иммуноглобулина и количественно оценить степень модификации белка. Получена и охарактеризована серия конъюгатов иммуноглобулина с синтетическим олигонуклеотидом.

Обзор литературы посвящен современным подходам и принципам дизайна флуоресцентных ДНК-зондов. Описаны каркас-модифицирующие реагенты для введения меток, придания устойчивости к протеолитическим ферментам и улучшения гибридизационных качеств, а также флуоресцентные красители и гасители флуоресценции для создания зондов. Рассмотрены ДНК-зонды для внутриклеточной визуализации *in situ* и *in vivo*. В последней части литературного обзора дана классификация флуоресцентных ДНК-зондов по структурным признакам и маркерам.

Работа выполнена в Лаборатории органического синтеза и Группе биоконъюгации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) при взаимодействии с коллегами из других подразделений Института, а также с коллегами из Сколковского института науки и технологий, МГУ им. М.В. Ломоносова, Института проблем лазерных и информационных технологий РАН, Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора и Российского кардиологического научно-производственного комплекса.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

Флуоресцентные ДНК-зонды

1.1. Основные принципы дизайна олигонуклеотидных зондов

ДНК-зонды – олигонуклеотидные молекулы длиной от полутора десятков до нескольких сотен и тысяч нуклеотидов, содержащие в своем составе неприродную модификацию – маркер, который позволяет выявить комплементарную последовательность или молекулу неолigonуклеотидной природы при помощи физических методов анализа. ДНК-зонды были введены в лабораторную практику после развития методов автоматизированного твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов. Вскоре были отработаны методы введения меток в состав олигонуклеотидной последовательности, как в ходе твердофазного синтеза, так и пост-модификацией. Кроме того, развитие технологии полимеразной цепной реакции и ник-трансляции позволило вводить модификации в длинные олигонуклеотидные последовательности с использованием неприродных нуклеозидтрифосфатов. Распознавание мишени сенсором на основе нуклеиновых кислот происходит за счет связывания его с олигонуклеотидной последовательностью. Условно можно выделить два типа аналитов, определяемых олигонуклеотидными зондами. Если связывание зонда происходит с комплементарной ДНК/РНК-мишенью, распознавание кода происходит за счет Уотсон-Криковских или Хугстиновских взаимодействий. Аналиты неолigonуклеотидной природы (ионы, белки и протеины, низкомолекулярные органические соединения) возможно обнаруживать при помощи НК-зондов на основе аптамеров за счет трехмерного связывания[1–3].

Исторически маркерами для олигонуклеотидных зондов помимо флуоресцентных красителей служили спиновые метки[4,5], наночастицы золота[6,7], электрохимически-активные[8] и радиоактивные метки[9], позволяющие проводить детекцию при помощи соответствующих физических методов анализа, а также аффинные и ферментативные метки. Каждый тип маркера имеет специфические области применений. Так, например, радиоактивные изотопы в качестве маркера широко применяются при визуализации электрофореграмм при помощи автордиографии в Саузерн- и нозерн-блоттинге, некоторые позитрон-испускающие радиоизотопы применяют в качестве щадящего излучения при позитрон-эмиссионной томографии (ПЭТ)[9]. Аффинные метки позволяют избирательно связать олигонуклеотидный зонд, например, с твердофазным носителем или флуоресцентно-меченным белком за счет высокоаффинных пар: биотин/стрептавидин,

антитела/дегексигенин и проч. В качестве ферментативной метки в олигонуклеотидных зондах используют пероксидазу хрена, которая после гибридизации с мишенью зонда окисляет субстрат при каталитическом разложении перекиси водорода. С развитием методов модификации олигонуклеотидов, на сегодняшний день большинство из вышеперечисленных маркеров уступают области применения флуоресцентным НК-зондам в лабораторных методах анализа.

Наиболее примитивным вариантом флуоресцентных зондов являются гибридизационные зонды – линейные олигонуклеотидные последовательности с одним или несколькими флуорофорами. Принцип использования таких зондов предельно прост: после гибридизации и отмывки избытка зонда прокрашенным остается лишь комплекс ДНК-мишени с комплементарным зондом. Простота таких зондов не позволяет использовать их в растворе: ДНК-мишень должна локализоваться внутри клетки или быть иммобилизована на поверхности. Они используются при картировании геномов методом FISH, визуализации ДНК/РНК в живых клетках и флуоресцентных вариантах проявления блоттинга ДНК и РНК на нитроцеллюлозной подложке как альтернатива зондам, меченных радиоактивным ^{32}P -изотопом[10].

Аффинность и специфичность последовательности - ключевые параметры олигонуклеотидных зондов, которые могут быть выражены разницей свободной энергии самого зонда и его дуплекса с мишенью[11]. В упрощенном виде аффинность можно выразить через $T_{пл}$ гибрида зонда с матрицей; на нее оказывают влияние длина и GC-состав последовательности, модификации олигонуклеотидной цепи и природа маркера, состав гибридизационного буфера, вторичная структура зонда и мишени[12,13]. Специфичность зонда к конкретной последовательности условно означает его избирательность и чувствительность к полиморфизмам матрицы. Т.е. ее определяет разница $T_{пл}$ дуплекса с полностью комплементарной мишенью и частично комплементарной[14]. Стоит отметить, что с увеличением длины зонда возрастает его аффинность (общее сродство к мишени) и снижается специфичность. Две эти характеристики имеют ключевое значение при дизайне флуоресцентных зондов во всех гибридизационных методах: внутриклеточной визуализации, кПЦР, определении однонуклеотидных полиморфизмов, микрочиповых технологиях. Для подбора оптимальной структуры НК-зондов и определяемой последовательности мишени в настоящее время существует многочисленное программное обеспечение (**табл. 1.1**).

Таблица 1.1 Вспомогательное программное обеспечение для дизайна последовательности зондов.

	ПО/базы данных	Электронный ресурс URL
Предсказание вторичной структуры	Dynalign[15]	http://rna.urmc.rochester.edu/
	mFOLD[16,17]	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/
	Pfold[18]	http://www.daimi.au.dk/~compbio/rnafold/
	sFOLD[19,20]	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/sfold/index.pl
Выравнивание последовательностей	ClusalW[21]	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/#
Предсказание температуры плавления	DINAMelt[22,23]	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/hybrid2.php
	HYTHER[24,25]	http://ozone2.chem.wayne.edu/
Дизайн структуры зонда	ARB[26]	http://www.arb-home.de/
	PRIMROSE[27]	http://www.cardiV.ac.uk/biosi/research/biosoft/
	probeBase[28–30]	http://www.microbial-ecology.net/probebase/
Базы данных РНК последовательностей	European Nucleotide Archive[31]	http://www.ebi.ac.uk/ena
	European RibosomalRNA Database[32]	http://www.psb.ugent.be/rRNA/
	GenBank[33]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/ [64]
	probeBase[30]	http://www.microbial-ecology.net/probebase
	Ribosomal DatabaseProject II[34,35]	http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp
	5S Ribosomal RNA Database[36]	http://biobases.ibch.poznan.pl/5SSData/

1.1.1. Неприродные модификации основной цепи зонда

Для повышения специфичности коротких зондов в их структуру вводят ненуклеозидные модификации или используют миметики олигонуклеотидов, в которых сахаро-фосфатный каркас заменен на какой-либо другой. Такие модификации, как правило, усиливают Уотсон-Криковские взаимодействия зонда с мишенью в сравнении с природными нуклеотидами (**рис. 1.1**), а некоторые из них также повышают устойчивость зонда в отношении эндогенных рибонуклеаз. В значительной мере некоторые модификации позволяют повысить специфичность зонда при той же длине последовательности. Обычно для этих целей применяют зонды на основе пептидно-нуклеиновых кислот (PNA)[37,38] или вводят фрагменты конформационно-блокированных (замкнутых) нуклеотидов (LNA)[39–41]. 2'-F РНК[42], 2'-OMe[43,44], 2'-ОМОЕ[45,46] и тиофосфатные РНК[47,48] обладают несколько большей аффинностью к ДНК/РНК мишени, при этом значительно устойчивее РНК и применяются для гибридизации в живых клетках. 2'-F РНК не применяются для флуоресцентных зондов из-за своей дороговизны. Морфолиновые олигонуклеотиды увеличивают стабильность дуплекса и чрезвычайно устойчивы к рестриктазам, но используются исключительно для РНК интерференции. Морфолиновые олигонуклеотиды синтезируются последовательной

конденсацией диметиламинофосфорилдихлорида и N-третилморфолинового аналога нуклеозида[49]. Пептидно-нуклеиновые кислоты доступны стандартным пептидным синтезом с участием *N*-Boc или *N*-Fmoc защиты основной цепи. Остальные модификации вводятся при помощи амидофосфитного синтеза. Замкнутые нуклеотиды (LNA) вводятся в количестве одной или нескольких модификаций в каркас зонда. Термодинамическая стабильность дуплекса РНК-мишени с зондом возрастает в ряду: ДНК < РНК < 2'-ОМе РНК < 2'-F РНК < LNA/PNA[50,51].

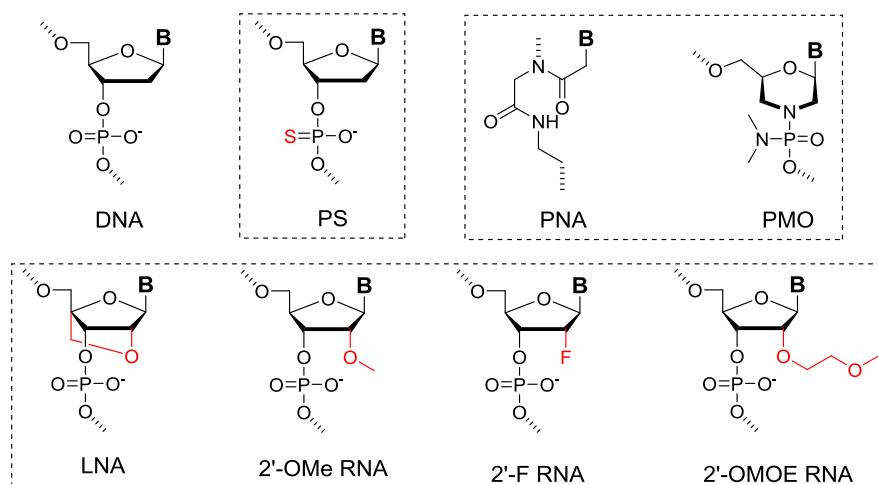


Рис. 1.1 Модификации сахарофосфатного остова зондов и миметики нуклеиновых кислот.

1.1.2. Ненуклеозидные суррогаты для модификации олигонуклеотидной цепи

Для эффективной работы флуоресцентного ДНК-зонда принципиальным является способ фиксации красителей на олигонуклеотидной цепи. Квантовый выход флуоресценции маркера и, соответственно, отношение полезный сигнал/фон (SBR, signal-to-background ratio) зонда сильно зависит от способа и сайта присоединения. На эффективность флуоресценции в первую очередь влияет взаимное расположение донора (флуоресцентной метки) и акцептора (тушителя), а также взаимодействие акцептора с олигонуклеотидной последовательностью. Часто снижение квантового выхода флуоресценции собственной последовательностью зонда и/или мишени достигает десятков процентов. Особенно это заметно для ПАУ, испускающих в голубом диапазоне. Гуанидиновые основания особенно склонны к абсорбции энергии флуорофоров. Подробно тушение нуклеотидами последовательности и акцепторными красителями флуорофоров широкого ряда было исследовано Сальватором Маррасом с соавт.[52]

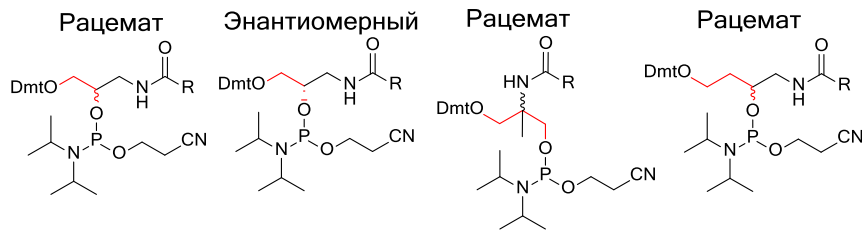
Для введения флуоресцентных красителей в середину последовательности зонда часто прибегают к ненуклеозидным фосфамидитам с ДМТ защитной группой. Амидит и ДМТ группу разделяют, как правило, 2-5 атомов, мономеры получают из энантиомерно чистых, прохиральных, ахиральных субстратов или рацематов. Прекурсорами для

реагентов являются замещенные глицерины, алифатические аминодиолы, восстановленные гидроксиаминокислоты и прочие субстраты (рис. 1.2). Диметокситритильной группой защищают первичный спирт, фосфамидит вводят по первичной или вторичной гидроксильной группе. Модификацию реагентов метками, как правило, осуществляют через образование амидной связи или простого эфира. Особенно стоит отметить способ введения донорного и акцепторного флуорофоров в середину последовательности двухцепочечного стебля в шпильчных зондах. Такое расположение приводит к тесному взаимодействию плоских флуорофоров за счет стэкинг-взаимодействий между пар оснований комплементарных нуклеотидов.

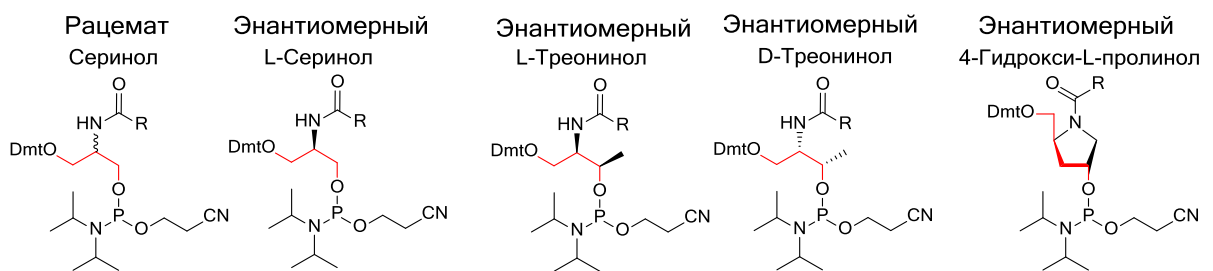
Замещенные глицерины



Алифатические аминодиолы



Восстановленные гидроксиаминокислоты



Прочие

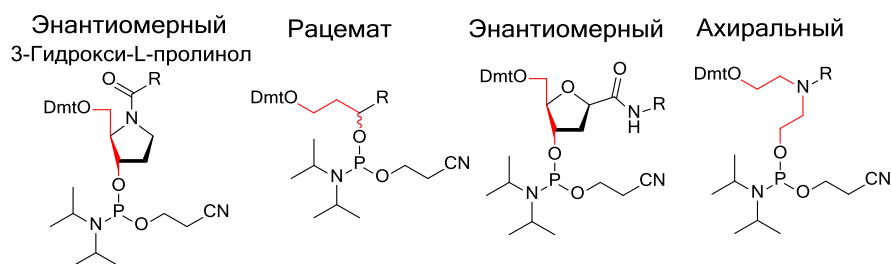


Рис. 1.2 Примеры ненуклеозидных фосфамидитов для модификации олигонуклеотидных зондов.

1.1.3. Флуоресцентные маркеры

Обычно флуоресцентные олигонуклеотидные зонды содержат, по крайней мере, один флуоресцентный краситель. Как правило, такие флуорофоры представляют плоские органические молекулы, испускающими в диапазоне от синей до ближнекрасной области видимого спектра. Для успешного использования органических красителей в качестве флуоресцентной метки они должны обладать высокими квантовыми выходами флуоресценции и молярными коэффициентами поглощения ($\Phi_f > 0.5$, $\epsilon > 50000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), поскольку яркость флуоресценции такого красителя определяется количеством поглощенных и переизлученных фотонов и пропорциональна произведению указанных величин. Красители с узкими полосами люминесценции также являются предпочтительными, особенно для приборов с канальной регистрацией сигнала и предназначенных для мультиплексных анализов. Логично, что помимо фотофизических требований, флуоресцентные маркеры должны обладать определенной фотостабильностью и инертностью в водных и физиологических средах, а иногда - и при повышенных температурах. Более того, желательно, чтобы краситель выдерживал условия синтетического цикла стандартного олигонуклеотидного синтеза, щелочного деблокирования и удаления с твердого носителя и очистку электрофорезом в полиакриламидном геле или ВЭЖХ. В противном случае маркер вводится пост-синтетически уже в очищенную НК-последовательность, что, естественно, приводит к удорожанию и удлинению синтеза зонда. По классам соединений (химической природе) флуорофоры для олигонуклеотидных зондов можно разделить на: полиароматические углеводороды (ПАУ), кумарины, ксантены (производные флуоресцеина и родамины), цианиновые красители, BODIPY (4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацены).

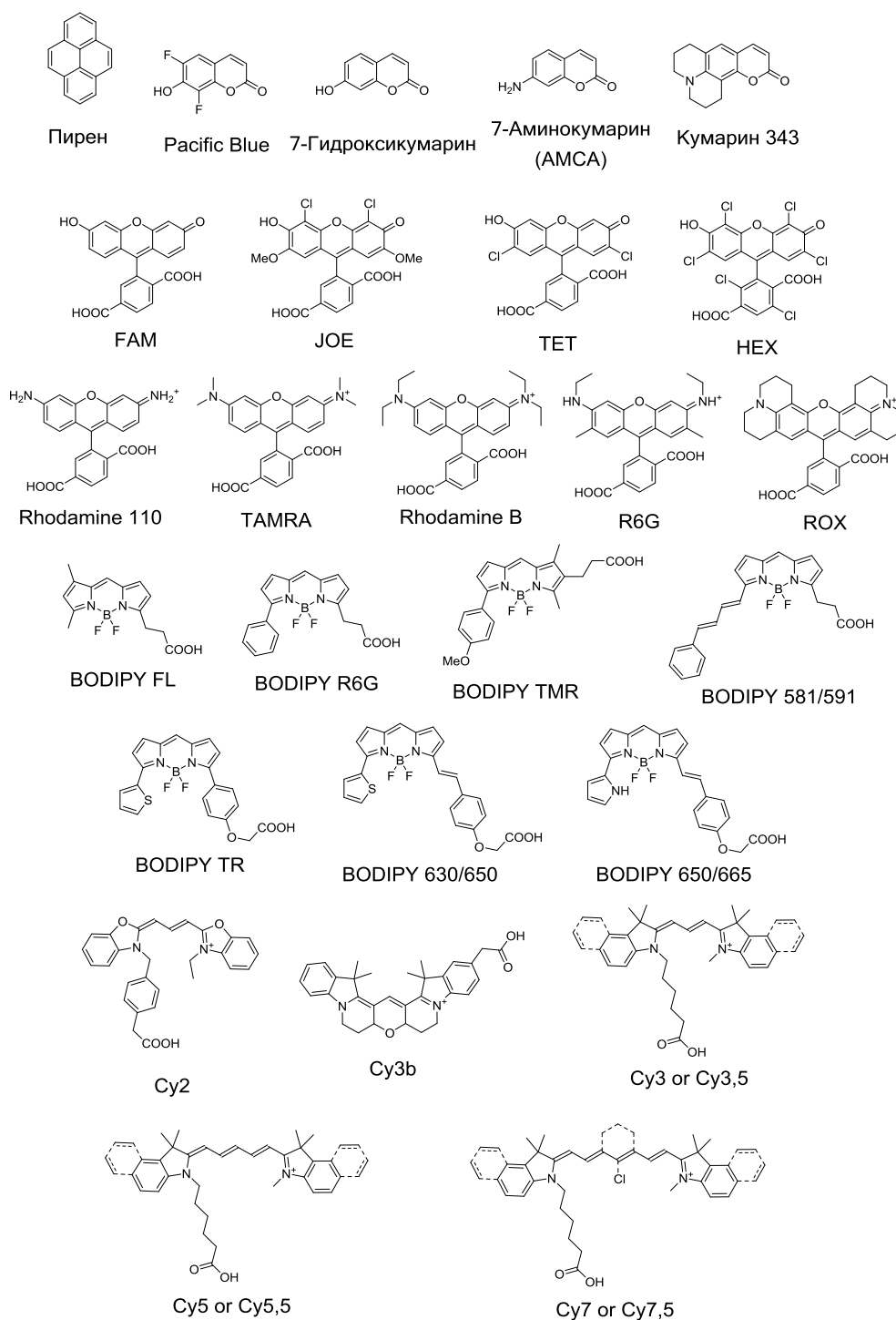


Рис. 1.3 Флуоресцентные красители для мечения олигонуклеотидных последовательностей. Для ксантеновых красителей приведены структуры 6-карбокси региоизомеров. Пунктирными линиями отмечены аннелированные циклы в цианиновых красителях с дробными названиями: Cy3,5, Cy5,5, Cy7,5.

Флуорофоры, представленные на **рис. 1.3**, имеют многочисленные аналоги и производные (в том числе сульфированные), известные под различными торговыми названиями; структуры многих красителей пока официально не раскрыты. Тем не менее, приведенные структуры дают представление о наиболее применимых классах красителей для мечения олигонуклеотидов. Каналы возбуждения/регистрации флуоресценции

приборов часто называют в честь коммерческих аббревиатур красителей, например для ПЦР-амплификаторов: FAM/SybrGreen, JOE/Hex, TAMRA/Cy3, ROX, Cy5.

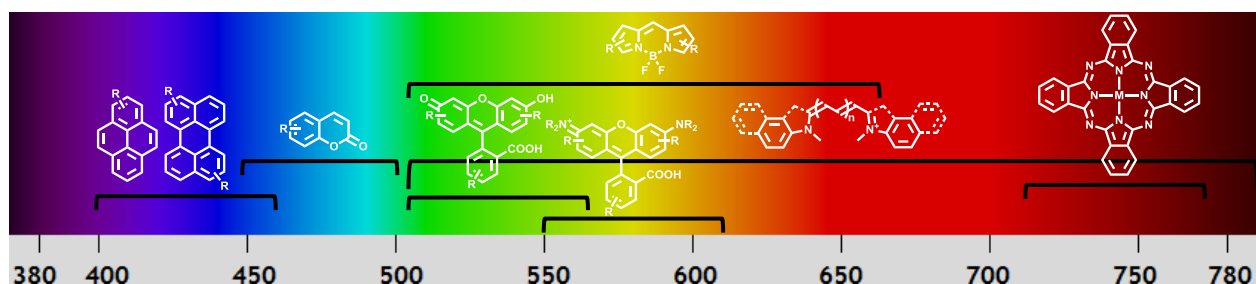


Рис. 1.4 Покрытие УФ-видимого диапазонов основными классами флуоресцентных маркеров.

Сегодня ассортимент флуорофоров покрывает ближнюю УФ-область, видимый и ближний ИК-диапазоны и позволяет подобрать подходящие по параметрам красители. Такое разнообразие позволило ввести в практику параллельные мультиплексные методы анализа нескольких аналитов в реальном времени. Критичным для таких анализов являются узкие полосы флуоресценции маркеров и их слабое перекрывание друг с другом. Таким образом, максимальное количество каналов детекции лимитировано: для кПЦР амплификаторов оно обычно ограничено шестью[53], а для визуализации в живых клетках редко применяют более трех зондов одновременно[54]. Для кариотипирования генома методом FISH используют набор из полинуклеотидных зондов, содержащих до пяти флуоресцентных маркеров. После комбинаторной гибридизации 23 пары хромосом окрашиваются несколькими флуорофорами, в результате для анализа такого мультиплексного FISH (M-FISH) последовательно анализируют расположение индивидуального маркера на хромосоме при помощи системы фильтров[55].

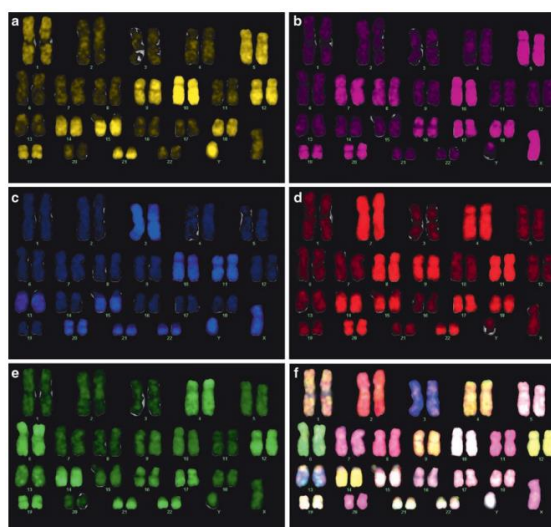


Рис. 1.5 M-FISH кариотипирование генома человека при помощи пяти флуоресцентных маркеров: а-е) изображение флуоресценции индивидуального зонда в канале детекции красителя; ф) наложение флуоресцентного сигнала. Фотография из книги *Methods in molecular biology*[55].

1.1.4. FRET (*Förster resonance energy transfer*) в олигонуклеотидных зондах

Применение гибридизационных зондов, меченных одним флуорофором, ограничено гистологическими методами и блоттингом, когда возможна отмычка от избытка зонда. Для жидкофазного детектирования НК-мишеней необходимо создание олигонуклеотидных сенсоров, способных к усилению флуоресценции при связывании с комплементарной мишенью. Очевидно, что в таких зондах немаловажное значение имеет вторичная структура зонда и со-расположение донора и акцептора флуоресценции. Суть принципа работы такой тандемной системы заключается в переносе энергии возбуждения флуорофора на акцептор за счет контактного или резонансного (FRET – Förster Resonance Energy Transfer) механизма переноса[56] при достаточно близком их расположении в негибридизованной форме зонда и отсутствии переноса при расхождении донора и акцептора в пространстве. Как результат, происходит усиление интенсивности флуоресценции. Важными параметрами такой системы является не только «яркость» фотохрома, но и эффективность поглощения энергии тушителем, т.е. отношение полезный сигнал/шум (SBR – signal-to-background ratio). Если яркость флуоресценции зонда в гибридизованном виде можно условно описать как произведение коэффициента молярного поглощения на квантовый выход флуоресценции, то фоновый сигнал определяется эффективностью поглощения энергии акцептором.

Для подбора донорно-акцепторной пары хромофоров в качестве меток прибегают к теории Ферстеровского переноса энергии. Эффективность резонансного переноса энергии описывается уравнением [I]:

$$E = \frac{k_{ET}}{k_f + k_{ET} + \sum k_i} \quad [I]$$

где k_{ET} – константа скорости переноса энергии, k_f – константа скорости излучательной релаксации, а k_i – константы других безызлучательных путей релаксации энергии донора. Непосредственно константа скорости резонансного переноса описывается уравнением [II]:

$$k_{ET}(r) = \frac{Q_D k^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad [II]$$

где Q_D – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора, n – показатель преломления среды, N – число Авогадро, τ_D – время жизни возбужденного состояния донора в отсутствие акцептора, F_D – относительная интенсивность флуоресценции донора в диапазоне от λ до $\lambda + \Delta\lambda$, $\varepsilon_A(\lambda)$ – молярный коэффициент поглощения, k^2 – фактор описывающий взаимное расположение двух векторов диполей донора и акцептора ($0 \leq k^2 \leq 4$), который обычно принимают равным 2/3, если донор и акцептор не жестко фиксированы друг относительно друга. Интегральная часть выражает степень

перекрывания спектров испускания донора и поглощения акцептора и обозначается для упрощения $J(\lambda)$.

Важнейшей величиной, качественно характеризующей пару донор/акцептор, выступает Ферстеровский радиус R_0 – расстояние, при котором эффективность переноса составляет 50%, обычно лежащее в диапазоне 10–100 Å. Применимо к практике величина R_0 говорит о том, на какое расстояние возможно разнести донор и акцептор для эффективного переноса энергии. Исходя из связи R_0 с k_{ET} :

$$k_{ET}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad [\text{III}]$$

и уравнения [III], принимая $k^2 = 2/3$ и $n \sim 1,335$ для водных буферных растворов, можно выразить уравнение для радиуса R_0 следующим образом:

$$R_0 = 0,163(Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad [\text{IV}]$$

Таким образом, для выбора донорно-акцепторной пары красителей необходимо учитывать квантовый выход донора и относительное перекрывание спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора. Характеристикой описывающей резонансный перенос непосредственно в самой структуре зонда выступает эффективность FRET, которая зависит от ряда параметров:

- расстояния между донором и акцептором (желательно порядка величины R_0 и менее);
- интеграла перекрытия спектра испускания донора и поглощения акцептора (должен быть максимальным);
- квантового выхода и времени жизни возбужденного состояния донора (чем выше оба значения, тем лучше эффективность переноса);
- ориентации вектора дипольного момента донора и акцептора (должны совпадать).

Однако ориентацию хромофоров, не фиксированных жестко относительно друг друга в структуре зонда, невозможно достоверно учесть, поэтому фактор ориентации принимают, как и для свободных хромофоров в растворе, равным $\kappa^2 = 2/3$. Количественным параметром, описывающим перенос энергии от донора к акцептору при резонансном переносе, является E - эффективность FRET. Эффективность FRET связана с Ферстеровским радиусом и расстоянием между донором и акцептором r следующим уравнением:

$$E = \frac{1}{1+(r/R_0)^6} \quad [\text{V}]$$

На практике эффективность резонансного переноса можно оценить по изменению интенсивности флуоресценции или времени жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора:

$$E = 1 - \tau'_D/\tau_D \quad [\text{VI}] \text{ или } E = 1 - I'_D/I_D \quad [\text{VII}]$$

где τ_D и τ'_D - времена жизни возбужденного состояния донора в отсутствии и присутствии акцептора, а I_D и I'_D - интенсивности флуоресценции донора в отсутствии и присутствии акцептора.

Ферстеровская теория резонансного переноса от донора к акцептору чрезвычайно эффективна при дизайне флуоресцентных зондов: а) при выборе флуоресцентного или темного тушителя, б) при подборе расстояния между донором и акцептором (особенно для TaqMan зондов). Однако помимо FRET, между донором и акцептором в олигонуклеотидных зондах часто имеет место быть контактный, или статистический, путь переноса энергии, его вклад может быть преобладающим при достаточно близком их сближении донора и акцептора. Кроме того, нередко изменение квантового выхода флуорофора при взаимодействии с олигонуклеотидной последовательностью вносит значительный вклад в спектральные свойства зонда и также не описывается теорией Ферстера. Излучательные же переносы энергии в оптимальных концентрациях зондов, как правило, столь ничтожны, что не учитываются при расчетах.

1.1.5. Тушители флуоресценции

В ранних работах тушение флуоресцентного красителя в составе ДНК-зонда осуществлялось за счет акцепторного флуорофора, т.е. при изменении конформации или деградировании зонда изменялся спектр испускания. Классическими донорно-акцепторными парами были, например, AMCA/FAM, FAM/TAMRA, Cy3/Cy5. Позже в практику были введены темные тушители. После поглощения электрона темным тушителем энергия спектрального диапазона диссипирует в тепловую. Как правило, по своей природе они представляют собой электроноакцепторные азокрасители (**рис. 1.6**). Удлинение цепи сопряжения или введение поляризующих ауксохромных групп в структуры тушителей приводит к батохромному сдвигу максимума поглощения, так же как и для флуоресцентных красителей. Данная тенденция четко прослеживается в ряду азокрасителей Dabcyl – BHQ0 – BHQ1 – BHQ2 – BBQ650 – BHQ3. Серия гасителей Black Hole Quencher (BHQ) наиболее доступна и популярна для синтеза флуоресцентных зондов и охватывает практически весь спектральный диапазон[57]. Это несомненное преимущество для синтеза зондов, применяемых в мультиплексном анализе. Два производных родамина QSY-7 и QSY-21 обладают превосходными коэффициентами

молярного поглощения и узкими спектральными полосами. Характерно, что наличие остатков ароматических аминов в положениях 2 и 7 ксантенового трицикла приводит к полному исчезновению флуоресцентных свойств родаминов. Отдельного внимания заслуживает цианиновый тушитель IRDye QC-1, поглощающий в красном/ближнем ИК-диапазонах[58]. Данный краситель эффективен для работы флуоресцентных зондов внутри живых тканей, поскольку ИК-излучение глубоко проникает в биологические объекты.

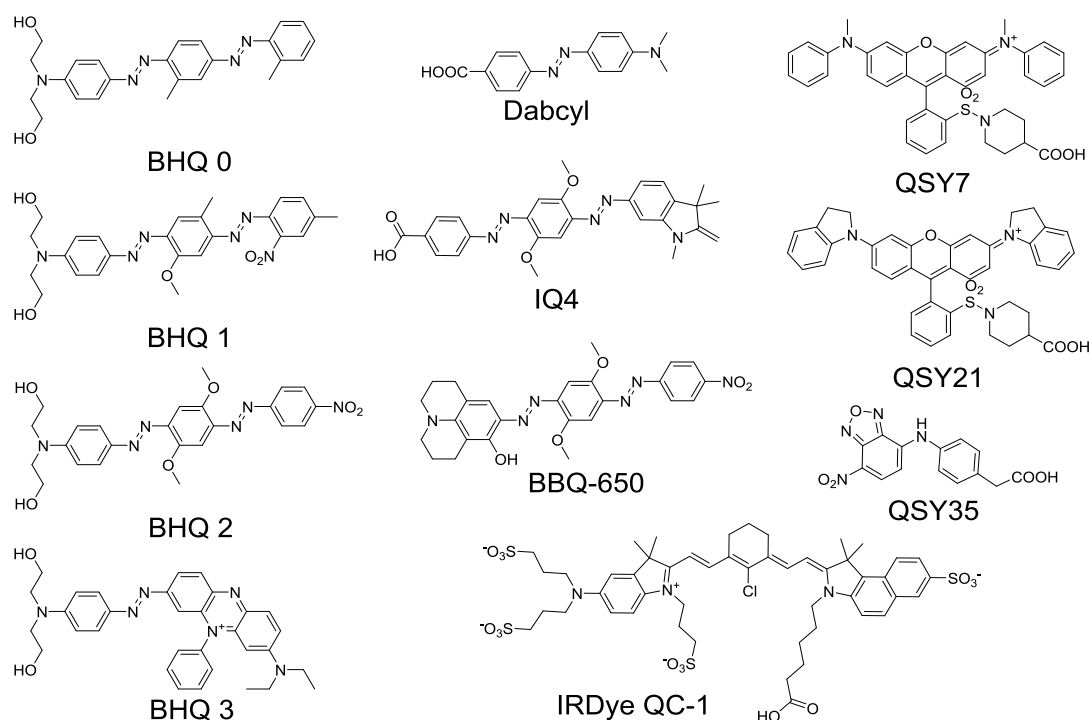


Рис. 1.6 Структуры некоторых функциональных производных темных тушителей.

Выбор тушителя - важный момент в дизайне флуоресцентных зондов; от эффективности тушения напрямую зависит фоновый сигнал флуоресценции, а также отношение полезный сигнал/фон (SBR, signal-to-background). Для подбора тушителя к флуорофору обычно руководствуются перекрытием спектров флуоресценции маркера и поглощения тушителя. Однако неоднократно было показано, что тушение флуоресценции темными тушителями может происходить как по механизму FRET, так и при соударении за счет контактного тушения[52,59]. Для последнего важным является пространственное взаиморасположение красителей и факторы, обуславливающие специфические взаимодействия (поляризованность, заряд молекул, липофильность и проч.). С другой стороны, перекрытие спектра флуоресценции с поглощением тушителя не вносит вклада при контактном переносе энергии. Т.е. при максимальном сближении флуорофора и гасителя эффективность тушения повышена за счет вклада обоих механизмов тушения. Поскольку разработка темных тушителей имеет коммерческий приоритет для применения

в флуоресцентных зондах, синтез большинства из них не описан в научных статьях, а иногда и вовсе не приводится в патентной литературе. Структуры наиболее популярных из них, известные на сегодняшний день, представлены на **рис 1.6**. Как правило, тушитель вводится в 3'-концевую последовательность зонда из модифицированного носителя для твердофазного синтеза и в редких исключениях - в середину последовательности или в 5'-положение.

Таблица 1.2 Спектральные характеристики темных тушителей флуоресценции.

Тушитель	Спектральный диапазон	λ_{\max}	ϵ_{\max} ($M^{-1} \times cm^{-1}$)
Dabcyl	400-550	453	32000
DeepDarkQuencherI (DDQI)	400-530	470	---
QSY 35 [®]	410-550	475	23000
Black Hole Quencher 0 (BHQ-0)	430-520	493	34000
Epoch Eclipse [™] Quencher	390-625	522	53000
Black Hole Quencher 1 (BHQ-1)	480-580	534	34000
QSY 7 [®]	500-600	560	90000
Black Hole Quencher 2 (BHQ-2)	520-650	579	38000
IQ4 Quencher	520-706	587	---
Deep Dark Quencher II (DDQ II)	550-750	630	---
BlackBerry [®] Quencher (BBQ-650 [®])	550-750	650	41000
QSY 21 [®]	590-720	661	90000
Black Hole Quencher 3 (BHQ-3)	620-730	672	42700
IRDye [®] QC-1 Quencher	600-900	737	98000

Кроме того, при дизайне флуоресцентных зондов необходимо учитывать возможные взаимодействия флуорофора с нуклеотидами последовательности. Как правило, конъюгация флуоресцентного красителя с олигонуклеотидами уже приводит к снижению квантового выхода флуоресценции, особенно при взаимодействии с гуаниновым основанием[52]. Редким исключением из этого правила (кроме специфических ДНК-связывающих красителей) оказываются цианиновые красители Су3, Су5 и прочие. Поскольку их невысокий квантовый выход флуоресценции в основном связывают с цис/транс фотоизомеризацией, связывание же красителя с биомакромолекулами приводит к затруднению этого процесса и увеличению вероятности излучательных переходов[60]. Поэтому место и способ введения флуорофора и гасителя в олигонуклеотидную последовательность не менее важны для удачного дизайна зонда, чем учет их индивидуальных фотофизических параметров.

1.1.6. Эксимерные и эксиплексные системы

Эксимер (возбужденный димер от англ. **excited dimer**) димерный комплекс, в котором одна молекула (группа атомов) возбуждаясь, сближена со второй в основном состоянии на достаточно близком расстоянии, что приводит к перекрыванию их молекулярных орбиталей и появлению общих возбужденных электронных уровней[61]. Возбужденный электрон переходит с НСМО мономера на НСМО эксимера с меньшей энергией, способен к излучательной релаксации. Визуально это приводит к появлению новой широкой полосы в спектре испускания с более длинноволновым максимумом и снижению интенсивности флуоресценции возбужденного мономера. Эксиплексом (возбужденный комплекс) – аналогичное понятие, относящееся к двум и более хромофорам различной природы. Среди органических красителей выраженной способностью образовывать возбужденные комплексы обладают ПАУ: антрацен, нафталин, пирен, изредка перилен, хризен, а также их производные.

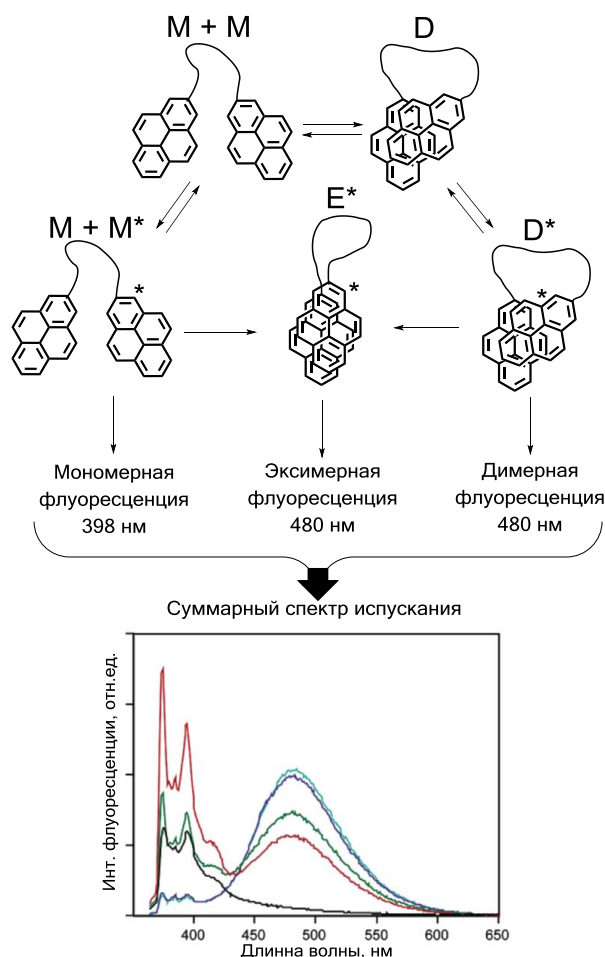


Рис. 1.7 Формальная схема образования длинноволновой полосы в спектре испускания пиренового эксимера. Подробно механизм образования эксимерной флуоресценции пирена описан в [62].

Наиболее стабильный эксимер способен образовывать пирен, при этом помимо испускания самого пирена в спектре появляется широкая полоса с максимумом в области 470–480 нм (**рис. 1.7**). Это свойство неоднократно использовалось для создания сенсоров на основе пиренового эксимера, в т.ч. и олигонуклеотидных зондах различных конструкций[63–66]. При сближении двух пиреновых хромофоров в составе зонда происходит смещение спектра испускания из синей в зеленую область. Этот принцип широко применяется для структурных исследований нуклеиновых кислот гибридными методами.

Из-за высокого времени жизни возбужденного состояния большинство флуоресцентных ПАУ чувствительны к микроокружению, т.е. способны передавать часть энергии возбуждения ему. В частности это проявляется в виде сильного тушения флуоресценции нуклеотидами, особенно гуанином. Такая способность ближайшей нуклеотидной последовательности сильно влияет на квантовый выход флуоресценции ПАУ лежит в основе многих методик определения однонуклеотидных полиморфизмов (подробнее смотри раздел: *1.3.6.1. Последовательность-чувствительные зонды на основе ПАУ*).

Эксимеры и эксиплексы на основе ПАУ обладают чрезвычайно высокими значениями Стоксова сдвига (>100 нм), что, вместе с хорошими квантовыми выходами флуоресценции, крайне редко встречается для других органических флуорофоров. Высокий Стоксов сдвиг позволяет предотвратить перекрывание каналов возбуждения и регистрации флуоресценции, повышая тем самым отношение полезного сигнала к фоновому в приборах с канальной регистрацией флуоресценции. Важнейшей характеристикой эксимера, помимо общего квантового выхода и молярного коэффициента поглощения, является соотношением максимумов эксимерной флуоресценции к мономерной (Е/М соотношение), описывающее вероятность образования эксимера. Однако если мономеры находятся в свободном состоянии в растворе или обладают достаточной подвижностью относительно друг друга, возникновение эксимерной флуоресценции носит статистический характер (динамический эксимер). Для придания эксимерным флуорофорам устойчивого спектра испускания с выраженной длинноволновой полосой требуется фиксация хромофоров относительно друг друга (статический эксимер)[62] (**рис. 1.7**). Группа под руководством Эрика Кула разработала способ создания устойчивых эксимерных и эксиплексных флуорофоров различных цветов, используя олигодезоксифлуорофоры (ODF)[67]. ODF – олигомерные гликозидные молекулы с дезоксирибозным сахарофосфатным остовом, которые в качестве агликанов содержат β -аномерные ПАУ или стильбеновые флуорофоры (**рис. 1.8А**). В результате

стекинг взаимодействий в таком олигомере происходит образование устойчивых эксиплексов с постоянными фотофизическими свойствами. Ими был синтезирован набор из 23 таких флуорофоров, возбуждающихся при УФ излучении ~354 нм (рис. 1.8Б).

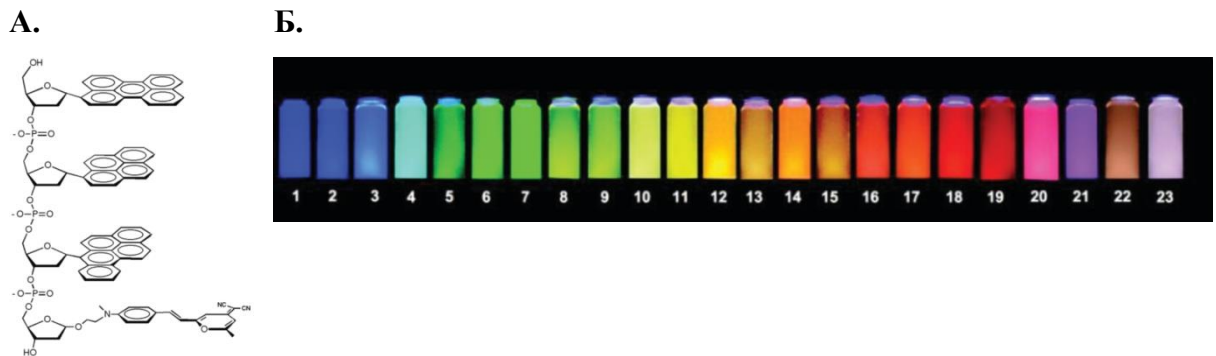


Рис. 1.8 ODF из статьи Э. Кула: Тео, Y. N.; Kool, E. T. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (7), 4221–4245[67].

К устойчивой эксимерной флуоресценции также приводит фиксация пиреновых флуорофоров в середине дуплекса между парами оснований. Для введения пирена в середину последовательности дуплекса обычно используют ненуклеотидные гибкие вставки. Такая методика использовалась для некоторых типов эксимерных молекулярных маяков (подробнее смотри раздел 1.3.1.4. *Эксимерные молекулярные маяки*).

1.2. Зонды для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)

1.2.1. Полинуклеотидные зонды

Как правило, для FISH используются полинуклеотидные ДНК-зонды длиной от нескольких сот до нескольких тысяч нуклеотидов с несколькими флуорофорами, полученные ПЦР[68] или *in vitro* транскрипцией[69,70] с использованием модифицированных нуклеозидтрифосфатов. Такая длина зонда обусловлена требованием к высокой специфичности зонда в отношении определенного участка ДНК/РНК из-за обилия генетического материала внутри клетки. С другой стороны, полинуклеотидные зонды оказываются неэффективны для детекции коротких РНК. Подбор индивидуальной последовательности и вариант флуоресцентного зонда для FISH являются критичными для анализа. В основе дизайна FISH-зондов лежит эмпирический подход, нередко требующий детальной оптимизации и подбора условий для снижения фоновой флуоресценции[71]. Полинуклеотидные зонды обладают слабой избирательностью в отношении полиморфных мишеней. Кроме того, неспецифическое связывания зонда[72], завышенная автофлуоресценция [69] и деградация в присутствии клеточных ферментов приводят к снижению отношения полезный сигнал/фон.

1.2.2. Олигонуклеотидные зонды

В качестве альтернативы полинуклеотидным зондам с несколькими метками в методе FISH также успешно применялись короткие олигонуклеотиды с одним флуоресцентным красителем, комплементарные нескольким участкам мРНК[73]. Очевидно, что олигонуклеотидные зонды, полученные твердофазным синтезом, намного доступнее в финансовом и временном отношении в сравнении с полинуклеотидными зондами, синтезированными с помощью ПЦР или ник-трансляции. Однако они проигрывают последним по специфичности и прочности связывания и яркости, что приводит к более тусклым изображениям в анализах *in situ* и повышенной фоновой флуоресценции[74]. Помимо структуры и последовательности зонда в значительной мере на качество изображений влияет и сам флуоресцентный краситель: квантовый выход флуоресценции и коэффициент молярного поглощения на длине волны возбуждения, тушение флуоресценции эндогенными соединениями и способность к неспецифическим взаимодействиям в клетке. Наиболее удачным флуоресцентным маркером для иммуногистохимического окрашивания среди прочих был выявлен цианиновый краситель Су3, который в значительной мере по своей яркости превзошел флуоресцеин, родамин TAMRA, сульфородамин В и TexasRed[75]. Позже Су3 стал самым популярным маркером олигонуклеотидных зондов для внутриклеточной гибридизации[76,77].

1.2.3. Непрямые способы мечения

Флуорофор, сигнал которого детектируется, обычно ковалентно присоединен к олигонуклеотидной последовательности (прямое мечение). Другой, более ранний вариант детекции, основан на использовании олигонуклеотидных конъюгатов с аффинными метками, биотином или дигоксигенином. При этом «прокрашивание» зондов происходит после их гибридизации с мишенью. В случае, если зонд биотинилирован, к нему добавляют меченый стрептавидин (авидин)[78,79], конъюгат олигонуклеотида с дигоксигенином прокрашивают дигоксигенин-специфическими антителами[80,81]. Хотя непрямой вариант мечения ДНК-зонда требует дополнительных реактивов и временных затрат, этот способ позволяет добиться более яркого сигнала флуоресценции за счёт присутствия на молекуле антитела или авидина нескольких молекул флуорофора. Кроме того, в случае непрямого мечения возможно каскадное усиление сигнала. Тем не менее, непрямое мечение всегда уступает по специфичности прямым методам гибридизации и в настоящее время постепенно вытесняется синтетическими флуоресцентными олигонуклеотидами[82,83].

1.2.4. CARD-FISH

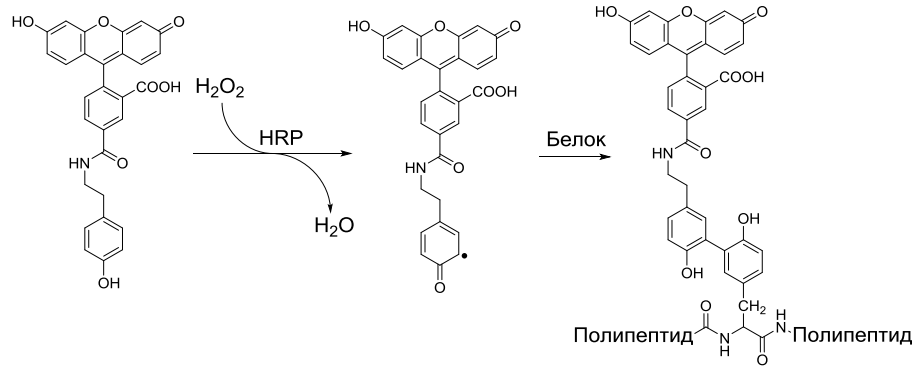


Рис. 1.9 Активация тирамидного субстрата с флуоресцеином при разложении перекиси водорода пероксидазой хрена.

Альтернативой флуоресцентно-меченым зондам в FISH служат зонды с пероксидазой хрена. При гибридизации таких зондов с мишенью внутри фиксированной клетки также добавляют пероксид водорода и субстрат, окисляемый при разложении перекиси. В качестве флуоресцентного субстрата для пероксидазных зондов, как правило, применяется аддукт тирамина с карбоксифлуоресцеином - FAM (**рис. 1.9**) или другим флуорофором. Остаток фенола в составе тирамида при окислении атакует электрон-избыточные группы, ближайшие к пероксидазе, тем самым окрашивая ее окружение, т.н. FISH с тирамидным усилением сигнала (CARD-FISH)[84,85]. Таким образом, одна молекула зонда активирует несколько флуоресцентных красителей, что приводит к каскадному усилению флуоресцентного сигнала. Использование тирамидных субстратов с несколькими красителями позволяет визуализировать одновременно несколько мишеней[86]. Пероксидаза хрена, однако, является довольно крупным маркером с молекулярной массой порядка 40 кДа, по сравнению с массой большинства флуоресцентных красителей (~500-800 Да), что оказывает влияние на эффективность прохождения зонда через клеточную мембрану и его специфичность. Несмотря на усиление сигнала флуоресценции в сравнении с флуоресцентными зондами, окрашивание с тирамидным субстратом уступает по интенсивности стандартной FISH ввиду слабого прохождения пероксидазных зондов через плазматическую мембрану[82]. Это приводит к необходимости оптимизации условий фиксации клеток и прокрашивания. Более того, для реакционноспособных тирамидных субстратов не характерна избирательность электрофильной атаки. Используемые для CARD-FISH протоколы успешно применялись для визуализации морских архей с высокой фоновой флуоресценцией при фиксации в агарозном геле, что привело к меньшим потерям популяции[87].

1.2.5. RCA-FISH

Усиление флуоресцентного сигнала возможно путем амплификации по типу катящегося колеса (RCA – rolling cycle amplification) с последующей гибридизацией олигонуклеотидных зондов (RCA-FISH)[88]. Так, после фиксации клеток на твердом носителе мишень гибридизуют с олигонуклеотидным зондом длиной порядка 90 нуклеотидов. Структура зонда такова, что 15-звенные 5' и 3'-концевые участки гибридизуются последовательно друг за другом, а зонд сворачивается в тор, который при обработке лигазой замыкается на матрице. Далее добавляются реагенты для проведения ПЦР уже на кольцевой матрице, проводя амплификацию в изотермическом варианте. В итоге на длинную повторяющуюся последовательность гибридизуют олигонуклеотидные зонды. Таким образом, на один фрагмент геномной последовательности приходится множество флуорофоров, что позволяет добиться значительного усиления сигнала. В случае детекции низкокопийных и труднодоступных последовательностей генома RCA-FISH успешно комбинировали с пептидно-нуклеиновыми кислотами (PNA)[89]. Дуплекс мишени денатурируют добавлением комплементарной PNA за счет более прочного взаимодействия PNA/ДНК, а вторая цепь выступает в качестве матрицы для лигирования кольцевой ДНК. Далее детекцию проводят аналогичным образом, как и в предыдущей методике.

1.2.6. bDNA-FISH и FISH-STICs

Похожий вариант усиления чувствительности носит название анализа с использованием разветвленных ДНК (branched DNA assay). Метод использует систему разветвленных олигонуклеотидных коннекторов, которые гибридизуясь с мишенью дают разветвленную структуру ДНК типа “расчёски” с многочисленными повторами последовательности. Далее гибридизацию олигонуклеотидных зондов осуществляют уже с этими разветвленными структурами, и на один определяемый участок мишени приходится до нескольких десятков зондов. Процедура усиления сигнала последовательной гибридизацией ДНК-посредников была предложена и успешно использовалась для выявления нуклеиновых кислот в плазме и сыворотке крови или клеточном лизате[90,91]. Для снижения неспецифичной гибридизации в последовательности всех олигонуклеотидных коннекторов и зондов могут вводиться неприродные нуклеотиды isoC и isoG.

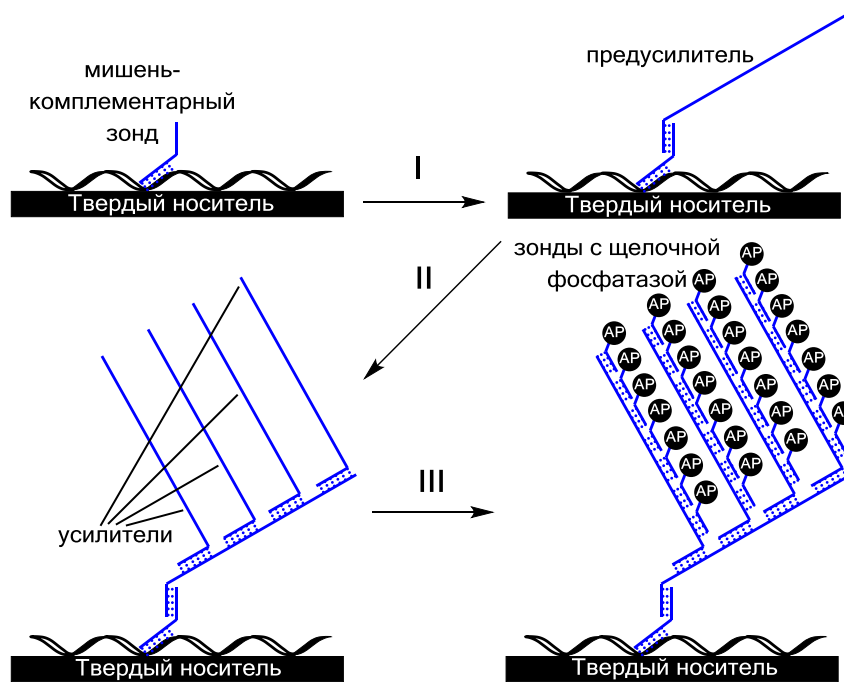


Рис. 1.10 Принцип усиления сигнала последовательной гибридизацией олигонуклеотидных коннекторов в bDNA-FISH.

Позже метод усиления был успешно применен для гибридизации ДНК и мРНК мишеней *in situ*. По чувствительности bDNA-ISH превосходит прочие методы непрямого мечения и позволяет выявить вплоть до 1-2 копий НК-мишени на субклеточном уровне[92]. Вначале для bDNA-FISH использовались олигонуклеотиды, меченные щелочной фосфатазой для визуализации НК. Для зондов с щелочной фосфатазой доступны несколько субстратов, которые, взаимодействуя с ферментом, окрашивают место локализации зонда. Все субстраты содержат фосфатную группу, при ее ферментном отщеплении происходит активация субстрата и последующий каскад химических превращений. При использовании стокового раствора NBT/BCIP гидролизуется фосфоэфирная связь, образуя нестабильный 3-гидроксииндол, который окисляется в производное индиго (**рис. 1.11А**). Окислителем выступает тетразолиевый субстрат, который превращается в формазановый краситель соответственно. Оба продукта реакции образуют голубой осадок, окрашивая область локализации фосфатазы. В другом варианте фосфат нафтола (Naphtol AS-MX phosphate), гидролизуясь, вступает в азосочетание с диазобензолом (Fast Red TR) (**рис. 1.11Б**). Выделяющийся оранжевый азокраситель также выпадает в осадок. Также, применение зондов с щелочной фосфатазой возможно и для анализа с детекцией флуоресцентного сигнала. Устойчивый диоксетановый субстрат CSPD при взаимодействии с фосфатазой фрагментируется, испуская фотон в голубой области спектра (**рис. 1.11В**)[93,94].

Современные варианты bDNA-FISH применяют зонды с флуоресцентными маркерами, это позволяет повысить контрастность метода и снизить размывание флуоресцентного сигнала в сравнение с хемилюминесцентными системами. Не так давно было продемонстрировано, что применяя амплификацию bDNA с флуоресцентными зондами можно достоверно детектировать единичные копии геномных последовательностей в клетках[95].

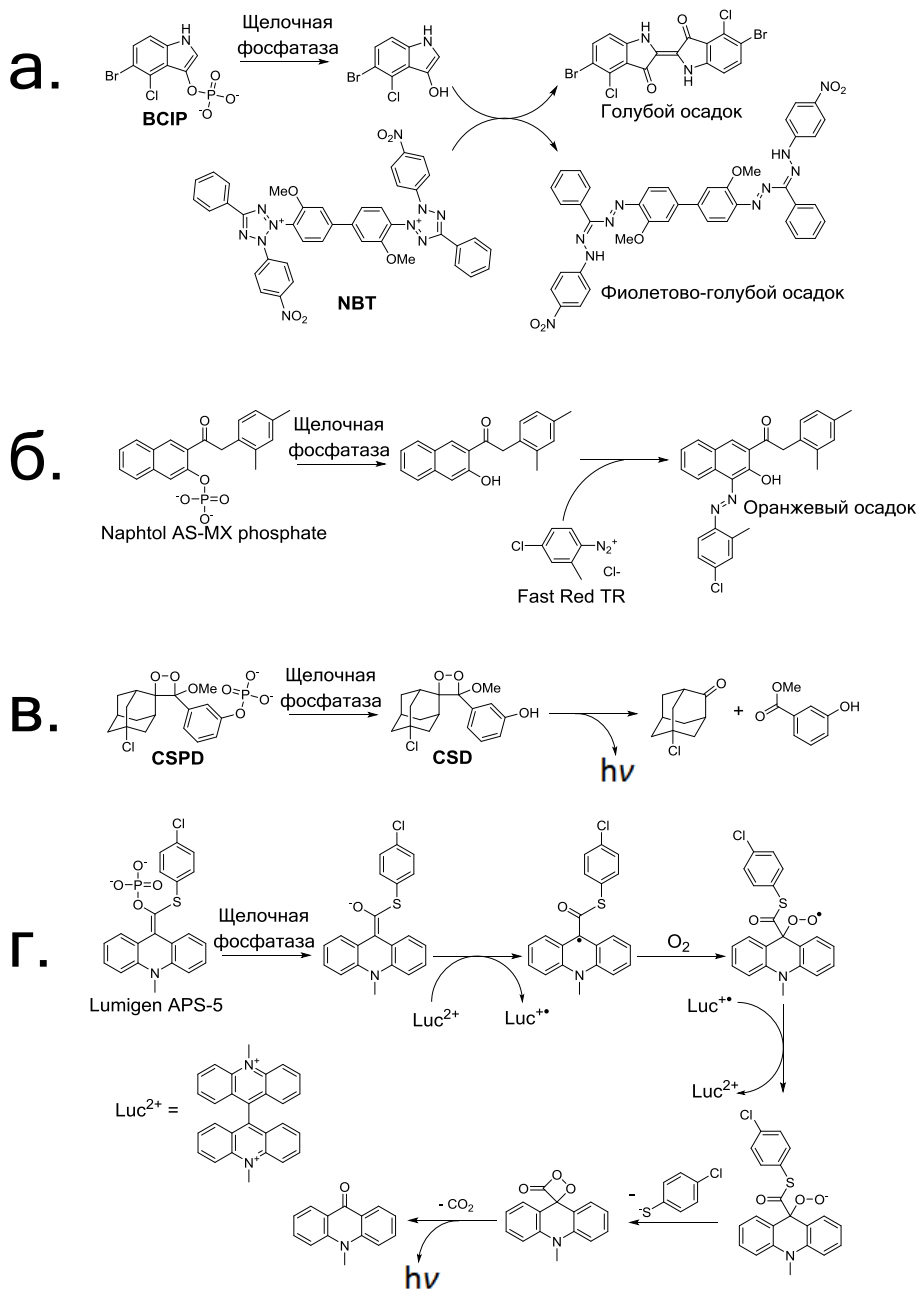


Рис. 1.11 Субстраты для щелочной фосфатазы: а. NBT/BCIP система для гистологического прокрашивания тканей (фиолетово-голубой осадок), б. нафталиновый субстрат Naphtol AS-MX phosphate, образующий азокраситель при взаимодействии с диазобензолом Fast Red TR (оранжевый осадок), в. стабильный диоксетановый субстрат CSPD для хемилюминесценции (флуоресценция в голубой области), г. хемилюминесцентный акридиновый субстрат Lumigen APS-5 применяемый с переносчиком электрона Luc²⁺, применяется для ELISA (флуоресценция в голубой области)[94].

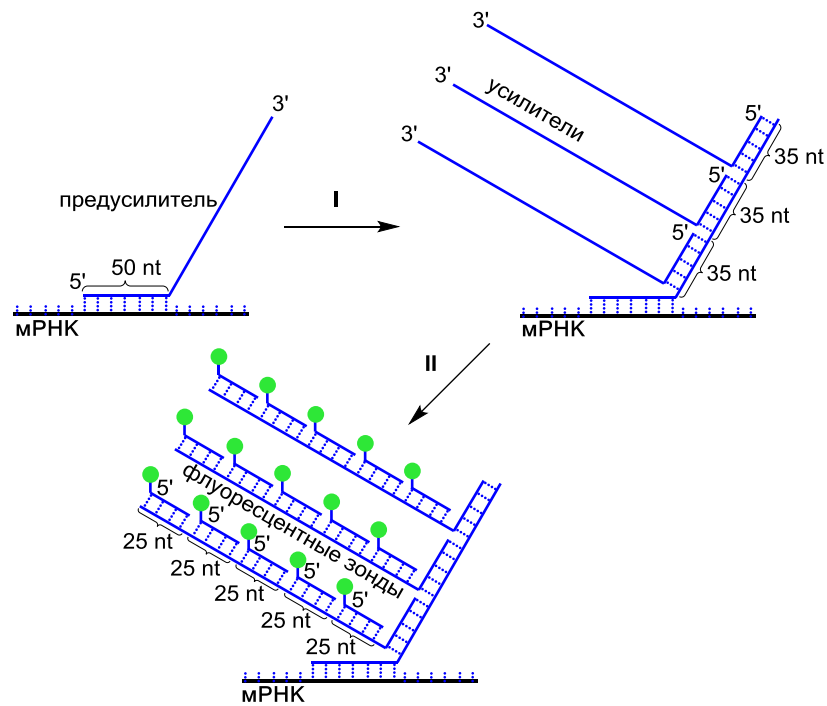


Рис. 1.12 Принцип гибридизации олигонуклеотидных коннекторов в FISH-STICs.

Поскольку олигонуклеотидные наборы для проведения bDNA-ISH являются интеллектуальной собственностью компании Affymetrix Inc. (QuantiGene probes from Panomics), их использование для лабораторного анализа сильно ограничено. В качестве альтернативы был предложен метод FISH-STICs (Sequential Tethered and Intertwined ODN Complexes), несколько упрощенный по сравнению с bDNA, с меньшим количеством стадий гибридизации (**рис. 1.12**). Метод успешно был использован для визуализации внутриклеточной мРНК с прокрашиванием флуоресцентными зондами[96].

1.2.7. HCR-FISH

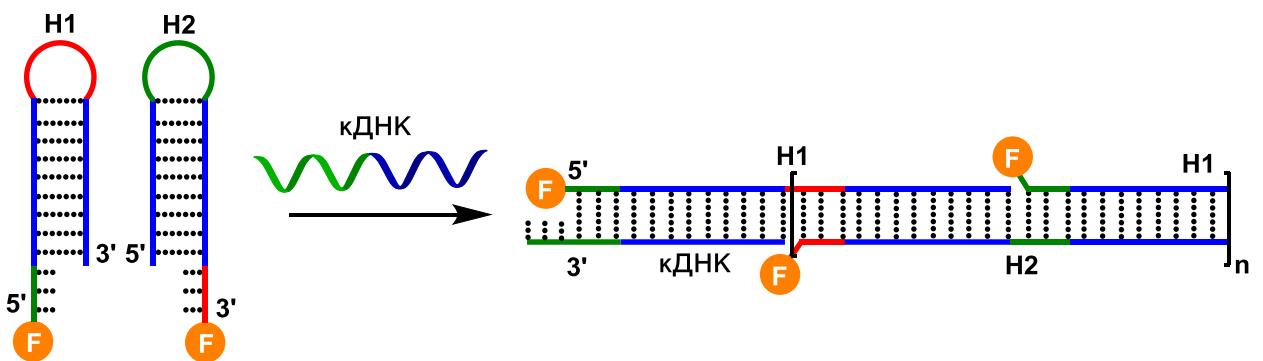


Рис. 1.13 Принцип каскадной гибридизации двух шпилечных зондов H1 и H2, инициируемый кДНК.

Гибридизационная цепная реакция была разработана в 2004 году Робертом Дирксом и Найлсом Пирсом[97,98]. Метод основан на каскадной гибридизации двух шпилечных олигонуклеотидов с липкими концами, инициируемой кДНК (**рис. 1.13**). При

этом обе шпильки метастабильны, они могут находиться длительное время в растворе без изменений, в отсутствие инициатора не происходит разворачивания стебля. Это достигается за счет длинного самокомплементарного участка длиной порядка 15-20 нуклеотидов (синий участок на **рис. 1.13**) и коротких липких концов, комплементарных петле менее 10 нуклеотидов (зеленый и красный участки на **рис. 1.13**). HCR служит неферментативным изотермическим методом детекции с усилением флуоресцентного сигнала, как альтернатива, например, количественной полимеразной цепной реакции. Один из свисающих концов зонда комплементарен мишени, после захвата происходит разворачивание стебля зонда и последующее связывание со второй шпилькой и так далее поочередно. Если оба шпильчатых олигонуклеотида мечены флуоресцентным маркером, один участок последовательности мишени прокрашивается серией зондов, что приводит к усилению флуоресцентного сигнала и возможности детектирования единичных последовательностей.

Гибридизационная цепная реакция была разработана, как и ПЦР, в нефлуоресцентном варианте, а анализ образования олигомерных продуктов гибридизации зондов проводили при помощи неденатурирующего гель-электрофореза. Диркс и Пирс также продемонстрировали возможность детекции мишени неолigonуклеотидной природы – АТФ за счет введения АТФ-связывающего аптамера в последовательность одной из шпилек. Метод амплификации сигнала HCR получил распространение в визуализации FISH и в живых клетках. Впервые использование флуоресцентного варианта HCR было продемонстрировано на зондах, меченных пиреном[99]. При добавлении ДНК-мишени зонды гибридизовались таким образом, чтобы пиреновые фрагменты сближались в дуплексе с образованием зеленой флуоресценции пиренового эксимера. Позже флуоресцентное мечение зондов для HCR широко применялось для усиления сигнала при визуализации живых клеток и гибридизации *in situ*[100,101]. Усиление флуоресцентного сигнала FISH с применением HCR достигает 200-кратного в сравнении с прямым мечением[101]. Разные комбинации флуоресцентных зондов позволяют проводить мультиплексный анализ[102]. Использование шпильчатых зондов с донорно-акцепторной парой флуорофоров позволяет избавиться от ложно-положительных сигналов и не проводить отмывки избытков зондов[103–105]. В нескольких работах были разработаны дендритные конструкции на основе каскадной гибридизации зондов. Разветвленные конструкции в отличие от линейных позволяют дополнительно усилить флуоресценцию[106–108]. HCR применяли также в непрямом варианте мечения с биотинилированными зондами и щелочной фосфатазой или пероксидазой[109–111]. Способ амплификации HCR прочно закрепился в иммунологических методах,

гибридизации *in situ* для визуализации РНК мишеней внутри единичных клеток и особенно срезов фиксированных тканей[112].

1.3. Классификация флуоресцентных олигонуклеотидных зондов

1.3.1. Молекулярные маяки

Молекулярные маяки это короткие олигонуклеотидные зонды длиной обычно 25-35 оснований. Для них сразу же было предложено множество применений: ПЦР в реальном времени[113], в качестве биочипов и биосенсоров[114,115], определение однонуклеотидных полиморфизмов[116,117] и т.д. Их отличительной особенностью является неотъемлемый элемент вторичной структуры – шпилька. При этом 5'- и 3'-концы последовательности находятся в непосредственной близости за счет самокомплементарного участка – стебля, расположенного по краям последовательности. В классическом варианте молекулярные маяки содержат пару хромофоров на концах последовательности – флуоресцентный краситель и тушитель флуоресценции. Связывание с мишенью НК осуществляется за счет мишень-комплементарной последовательности, которая находится в петле зонда и иногда захватывает частично или полностью участок стебля. При этом в отсутствие мишени зонд находится в шпильчатой форме, а флуорофор и тушитель сближены так, что флуоресцентный сигнал заведомо снижен. При денатурации стебля в ходе температурного плавления или связывания с НК-мишенью, концы зонда расходятся, и флуоресценция увеличивается за счет снижения переноса энергии от флуорофора к тушителю. Денатурация шпильки при изменении температуры является обратимой, что обуславливает применение зондов в кПЦР.

1.3.1.1. Классические молекулярные маяки

Идея конструкции молекулярных маяков принадлежит Тьяги и Крамеру[118]. Классическая структура молекулярных маяков содержит 4-8 пар оснований, связанных Уотсон-Криковскими взаимодействиями в стебле и 15-30 нуклеотидов в петле, 5'-конец связан с органическим флуорофором, а 3'-конец с тушителем флуоресценции, как правило, азобензольной природы (**рис. 1.14а**). В более поздних работах природа хромофоров в составе молекулярного маяка претерпевала значительные изменения. Так, были предложены зонды с донорно-акцепторной парой флуорофоров[104,119], пиреновым эксимером[120], флуоресцентным полимером[121], наночастицей золота[122], квантовыми точками[123]. Также были синтезированы молекулярные маяки с несколькими флуорофорами и тушителями[124–127].

Для анализа НК-мишеней внутри клеток особое значение уделяется выбору последовательности молекулярных маяков. Для повышения избирательности шпилечного зонда, как правило, стараются максимально увеличить участок комплементарный мишени, в том числе за счет нуклеотидов стебля[128]. Тем не менее, это не всегда удастся, и последовательность стебля, не комплементарная мишени, может вносить значительный вклад в неспецифические взаимодействия. Если не удастся максимально полно совместить мишень-комплементарную последовательность с последовательностью стебля, полезным решением является использование заведомо некодирующих последовательностей в составе стебля. Образование Хугстиновских пар между основаниями стебля позволяет вводить, например, полиаденозиновый фрагмент по концам ДНК-связывающего олигонуклеотида[129]. Пары А-А в составе стебля обеспечивают замыкание зонда в шпильку с затухнувшей флуоресценцией, при этом, не внося какого-либо значительного вклада в неизбирательное связывание такого зонда при визуализации внутриклеточных РНК-мишеней. В более поздних работах, связанных с дизайном молекулярных маяков, применению стебля с Хугстиновскими парами было уделено значительное внимание для реализации разнообразных архитектур зондов шпилечного формата.

1.3.1.2. Молекулярные маяки с несколькими флуорофорами и тушителями

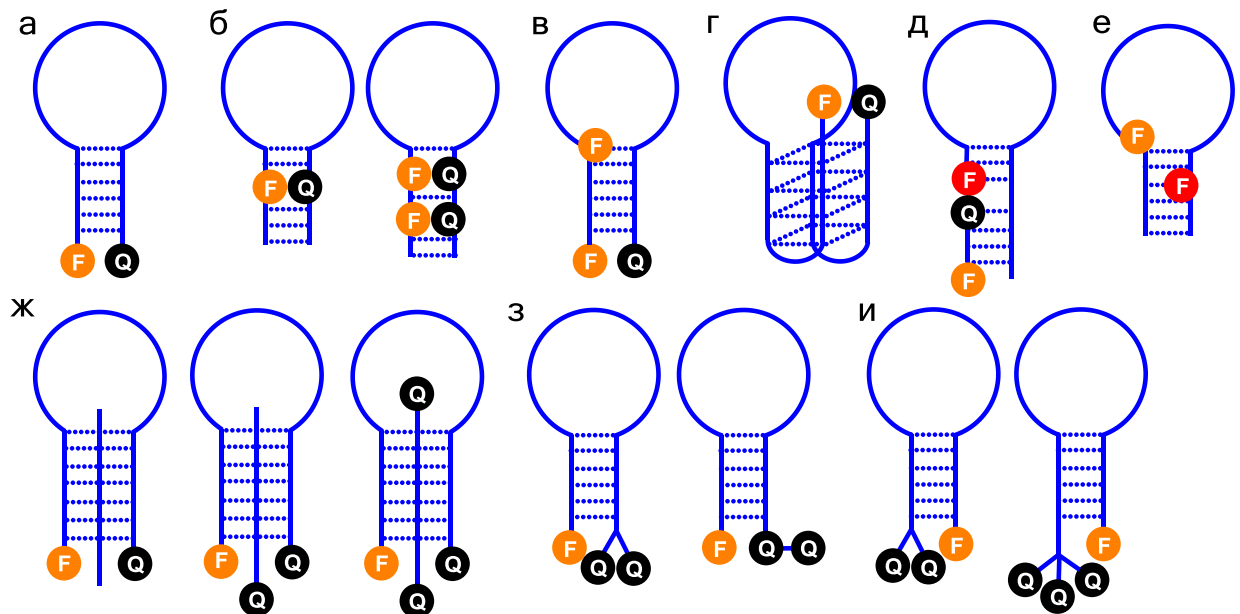


Рис. 1.14 Схематическое изображение различных вариантов молекулярных маяков.

В некоторых случаях флуоресцентный краситель вводится не в концевые положения олигонуклеотидного зонда, а в середину двухцепочечного участка молекулярных маяков – стебель. Такой способ введения метки целесообразен, когда одно- и двухцепочечная нуклеотидная последовательность по-разному влияют на хромофор или

оказывают дополнительные эффекты: а) квантовый выход флуоресценции снижен в дуплексе за счет поглощения энергии нуклеотидами, б) квантовый выход флуоресценции увеличен в дуплексе за счет фиксации флуорофора в стэкинге, в) реализуется более плотное взаимодействие донора и акцептора, фиксированных друг напротив друга в дуплексе.

В качестве маркеров олигонуклеотидных зондов были использованы флуоресцентные аналоги нуклеозидов: дезоксицитидин с аннелированным 2-метилпиррольным циклом и дезоксирибоаминопурин (**рис. 1.14е**). Встроенные в середину последовательности зонда неприродные нуклеозиды участвуют в образовании Уотсон-Криковских взаимодействий с гуанидином и тимидином, соответственно, практически не влияя на вторичную структуру нуклеиновой кислоты [130,131]. Их небольшой размер позволяет максимально приблизить структуру флуоресцентного зонда к природному олигонуклеотиду. Квантовый выход флуоресценции обоих флуорофоров в значительной мере зависит от ближайших нуклеотидов. Так, в шпилечном зонде флуоресценция пирролоцитозина затухает, поскольку он участвует в стэкинге в стебельной части, а аминопурин, наоборот, находясь в негибризованном состоянии в петле, флуоресцирует. При связывании с комплементарной мишенью стебель зонда раскрывается, а петля гибридизуется с мишенью; флуоресценция аминопурина при этом тушится, а пирролоцитозина увеличивается.

Для улучшения фотофизических характеристик молекулярных маяков – снижения фоновой флуоресценции и, как следствие, увеличения отношения полезный сигнал/фон при гибридизации, было предложено вводить флуорофор и тушитель в середину стебля (**рис. 1.14б**). В таком варианте хромофоры фиксированы и максимально сближены в дуплексе, что приводит к более эффективному тушению флуоресценции в сравнении с классическим вариантом мечения по концам зонда. Стоит отметить, однако, что для реализации такой структуры зонда, хромофоры должны вводиться в олигонуклеотидную последовательность на ненуклеозидных линкерах. В работе [132] с этой целью использовали реагент, полученный восстановлением тренина в соответствующий хиральный диол. Кроме того, данный метод не является универсальным, поскольку введение фрагментов красителей в середину олигонуклеотидной цепи зонда требует тщательного подбора пары флуорофор/тушитель и синтеза соответствующих ненуклеозидных мономеров. В данном случае описаны зонды, меченные периленовым флуорофором, антрахиноном, азабензолом или Dabcyl в качестве тушителей.

Введение дополнительного тушителя также позволяет снизить фоновый сигнал флуоресценции в замкнутой форме зонда. Впервые молекулярные маяки с несколькими

тушителями были представлены в 2005 г [133]. Флуоресцентный краситель FAM вводился в структуру зонда по 3'-концу через модифицированный пористый носитель для олигонуклеотидного синтеза, фосфамидиты с азокрасителем Dabcyl конденсировали с разветвляющимися реагентами на 5'-конце зонда (**рис. 1.14и**). С каждым дополнительным азокрасителем эффективность тушения возрастала с 92,9% до 98,75% и 99,7%, соответственно, а увеличение флуоресценции при гибридизации с 14 до 320 раз. Такой инверсный подход, однако, не получил распространения в последующих работах, поскольку более удобным и принятым является введение флуорофора в 5'-конец, а тушителя в 3'-положение зонда. Кроме того, коммерчески более доступными реагентами для синтеза флуоресцентных зондов являются модифицированные тушителем флуоресценции носители, и фосфамидиты или другие функциональные производные флуоресцентных красителей.

Позже были разработаны носители на основе пористого стекла, несущие разветвляющие реагенты для введения нескольких модификаций в олигонуклеотидную последовательность в ходе пост-синтетической Cu(I)AAC-модификации зонда [134]. Ранее в нашей группе был описан подход и реагенты для введения пары тушителей Black Hole Quencher 1 (ВНQ1) в структуру зондов (**рис. 1.14з**) [126]. Двойной тушитель описан в двух вариантах: последовательном и параллельном, в первом случае ВНQ1 фосфамидит конденсируется с ВНQ1-модифицированным носителем с последующей элонгацией олигонуклеотидной цепи, или же используют разветвляющий линкер с двумя терминальными тройными связями для введения двух остатков тушителей через азид-алкиновое присоединение пост-синтетически. Молекулярные маяки, меченные FAM и парой ВНQ1, были протестированы в ПЦР в реальном времени и продемонстрировали сниженный в несколько раз уровень фоновой флуоресценции. В данной работе также описан молекулярный маяк с дополнительным флуорофором, присоединенным через линкер к нуклеиновому основанию в положении между стеблем и петлей (**рис. 1.14в**). При немного завышенной фоновой флуоресценции значение флуоресцентного сигнала при гибридизации также оказалось больше в сравнении с зондом с одним флуорофором. При этом повышение отношения сигнал/фон при кПЦР наблюдалось только для зондов с двумя тушителями.

Нетривиальный способ добиться снижения фоновой флуоресценции был предложен Томом Гроссманом с соавт. [135] Они синтезировали зонды с терминальными политимидиновыми участками (8-T и 11-T) по обоим концам ДНК-связывающей последовательности. Замыкание в шпильку зонда осуществлялось под действием пептидно-нуклеиновой кислоты с 8 или 11 аденозиновыми остатками. Один конец зонда

образует Уотсон-Криковские пары с PNA, а второй - Хугстиновские, реализуя совместную тройную спираль-стебель (**рис. 1.14ж**). Такие структуры синтезировались в трех вариантах, концы шпильки модифицированы FAM и Dabcyl, а пептидно-нуклеиновая кислота содержала ноль, один или два остатка Dabcyl в концевых положениях. Триплексные зонды с разным количеством тушителей демонстрировали разную эффективность тушения флуоресценции: для стебля длиной 8 оснований с 77,6% до 98,3% и от 86,0% до 96,9 % для 11 нуклеотидов. Отношение сигнал/фон также возрастало от 6 до 20 раз. Данные зонды применялись для обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов: при добавлении комплементарных петле последовательностей тройная спираль стебля денатурировала с высвобождением PNA и увеличением флуоресцентного сигнала.

Серьезной проблемой при внутриклеточной визуализации молекулярными маяками оказывается появление ложноположительных сигналов при неспецифических взаимодействиях и денатурации стебля зонда. Помимо РНК и ДНК внутри живой клетки на раскрытие шпильки также могут влиять ДНК-связывающие белки, а протеолитические ферменты и вовсе могут привести к фрагментации последовательности зонда. Группой Энтони Чен с соавт.[136] был осуществлен рациональный дизайн структуры шпилечного зонда для внутриклеточной визуализации экзогенной РНК-мишени. Зонд состоит из двух олигонуклеотидов (**рис. 1.14д**). Один образует шпильку за счет короткого самокомплементарного участка, на конце которого содержит флуоресцентный маркер Су5. Дополнительный одноцепочечный участок, образует дуплекс со вторым олигонуклеотидом, меченным тушителем Iowa Black RQ quencher, и референсным флуорофором с испусканием в ближней ИК-области IRDye800. Два олигонуклеотида после гибридизации образуют конечный зонд. В замкнутой форме Су5 затушен, а при связывании РНК-последовательности с участком петли происходит усиление флуоресценции. Второй краситель не взаимодействует с тушителем, выполняя роль стандарта для нормирования флуоресценции Су5 при связывании с мишенью. Как указывают авторы работы, они старались максимально приблизить структуру зонда к малым интерферирующим РНК, поскольку, как они предположили, это скажется благоприятно на проникающей способности зонда. Доставку зонда проводили методом электропорации, стабильность к эндонуклеазам обеспечили олигонуклеотидным каркасом с 2'-ОМе модификациями.

Применение G-квадруплексного фрагмента в молекулярных маяках также возможно в качестве альтернативы каноничному стеблю-дуплексу (**рис. 1.14г**)[137]. Описанные зонды содержали НК-связывающую последовательность посередине и четыре

поли-G фрагмента, соединенных ТТА-мотивами. Концы зонда мечены стандартным образом, FAM и Dabcyl соединены через гибкие линкеры. Стабильность такого зонда сильно зависит от типа катионов в буфере, поскольку G-квадуплекс стабилизирован ионами K^+ , в меньшей степени Na^+ и диссоциирует в среде Li^+ солей.

1.3.1.3. Молекулярные маяки с переносом энергии

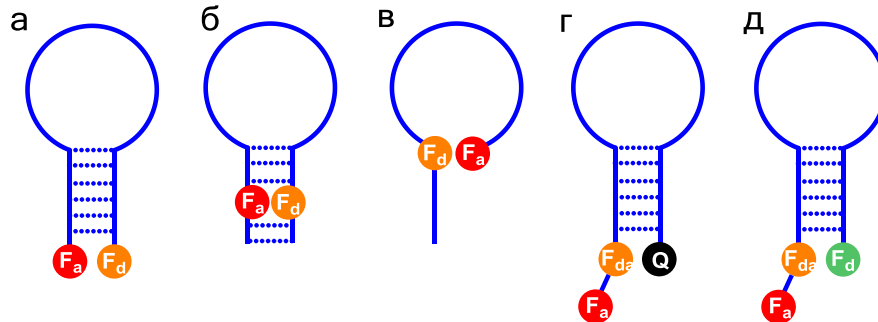


Рис. 1.15 Схематическое изображение молекулярных маяков с парой донорного и акцепторного флуорофоров.

Молекулярные маяки, меченные двумя флуоресцентными красителями – донором и акцептором флуоресценции, отличаются от классического варианта тем, что резонансный перенос от донора флуоресценции происходит не на темный тушитель, а флуорофор-акцептор с последующим испусканием фотона с меньшей энергией. Так, закрытая и связанная формы зонда обладают флуоресценцией двух разных спектральных диапазонов, что позволяет контролировать количественно не только флуоресцентный сигнал от гибридизованного с мишенью зонда, но также несвязанный с ней. Для изучения спектроскопических свойств молекулярных маяков, меченных донором и акцептором флуоресценции, в двух работах были подобраны две пары хромофоров: кумарин/FAM[138] и два родамина Alexa 488/RedX[139] (**рис. 1.15а**). Такие зонды удобны для двухканального варианта детекции флуоресценции. Флуоресцентный сигнал от каждого маркера позволяет оценить вклад свободного и связанного зонда, например, во внутриклеточном пространстве. Такой подход при удачном дизайне зонда и подборе флуорофоров позволяет улучшить отношение сигнал/шум по сравнению с классическим вариантом молекулярных маяков. Молекулярные маяки с флуоресцентным донором и акцептором применялись для отслеживания проникновения зонда внутрь клетки.

В середину стебля молекулярных маяков также вводились интеркалирующие красители тиазоловый оранжевый и тиазоловый красный (**рис. 1.15б**) [140]. При взаимодействии с двухцепочечной НК происходит многократное усиление квантового выхода флуоресценции обоих цианиновых красителей. В этой связи они располагались друг напротив друга в середине самокомплементарного участка зонда на ненуклеозидной

вставке. Тиазоловый оранжевый служит донором флуоресценции с максимумами поглощения и испускания 490/530 нм, соответственно, а тиазоловый красный, отличающийся на одну двойную связь, - акцептором с максимумами 640/670 нм. Так, при гибридизации с комплементарной матрицей оба флуорофора также находятся в непосредственной близости от двухцепочечного участка и сохраняют способность испускать свет, однако, при этом расстояние между ними значительно увеличивается и эффективность FRET резко снижается. Зонд в закрытой форме флуоресцирует в оранжевой области, а связанная – в зеленой. Молекулярный маяк, меченный тиазоловыми красителями сравнивали с типичным молекулярным маяком с парой флуоресцеин/тетраметилродамин (FAM/TAMRA). Чувствительность последнего оказалась в несколько раз ниже при гибридизации с НК-мишенью. В 2016 г. той же группой была опубликована работа [141], в которой применяли молекулярные маяки данной архитектуры с двумя парами других цианиновых красителей. Донор и акцептор в каждой паре обладали флуоресценцией в диапазонах голубой/желтый и зеленый/красный для максимального покрытия спектрального диапазона. Полученные в данной работе зонды применялись для внутриклеточной визуализации двух микро-РНК в раковых клеточных линиях.

Похожий принцип устройства молекулярного маяка представлен в работе [142]. Авторы представили бесстебельный зонд, который, тем не менее, как утверждается, образует шпильчатую структуру за счет сближения пары флуорофоров (**рис. 1.15в**). В качестве донора флуоресценции также выступал тиазоловый оранжевый в середине последовательности пептидно-нуклеиновой кислоты. В терминальное положение зонда введен акцепторный флуорофор пирониновой природы NIR667. В одноцепочечном состоянии PNA-зонд обладает слабой фоновой флуоресценцией ТО в зеленой области, NIR667 дополнительно тушится нуклеиновыми основаниями последовательности. Гибридуясь с комплементарной последовательностью происходит фиксация ТО относительно метинового мостика в дуплексе и перенос энергии на NIR667. Флуоресценция NIR667 при связывании с матрицей достигает 100-кратного усиления. В работе описано изучение полиморфизмов олигонуклеотидной матрицы с использованием синтезированных PNA-зондов.

Ограничения в использование молекулярных маяков вносит зачастую не только недостаточная чувствительность, обусловленная, как правило, ложноположительными сигналами. Для максимального разделения каналов возбуждения и детекции флуоресценции молекулярных маяков использовали зонды с несколькими флуорофорами с последовательным переносом фотона от одного на другой. В работе [118] был

предложен вариант классического молекулярного маяка с тушителем Dabcyl на 3'-конце и флуорофором FAM в 5'-положении, соединенным с дополнительным акцепторным флуорофором (рис. 1.15г). Таким образом, в закрытой форме флуоресцеин, поглощая квант света, передает основную энергию тушителю Dabcyl с переводом в тепловую. При денатурации шпильки энергия от флуоресцеина переносится на акцепторный флуорофор с последующим переходом и излучением фотона в более длинноволновой области. В качестве второго флуорофора были протестированы три родамина: 6-карбоксиходамин 6G (R6G), тexasский красный (Texas red) и тетраметилродамин (TAMRA).

В 2001 году был предложен олигонуклеотидный каркас, модифицированный тремя флуоресцентными красителями: FAM, TAMRA, Cy5,[143,144] расположенными через один или несколько нуклеотидов на 5'-конце зонда. При возбуждении FAM в голубом диапазоне (488 нм), происходит последовательный перенос энергии через TAMRA на Cy5 с испусканием в красной области (670 нм). В дальнейшем этот подход был предложен и для молекулярных маяков, по 5'-концу зонда вводили последовательно TAMRA и Cy5, а по 3'-концу - FAM[145] (рис. 1.15д). В закрытой форме зонда фотон, при поглощении флуоресцеином, переходит на цианиновый краситель Cy5. Стоксов сдвиг при таком последовательном переносе фотона достигает 180 нм в шпильчатой форме. При гибридизации перенос энергии на промежуточный донор TAMRA не осуществляется, и детектируется зеленый флуоресцентный сигнал. Такие молекулярные маяки были протестированы при гибридизации с комплементарной мишенью в стационарном и времяразрешенном варианте.

1.3.1.4. Эксимерные молекулярные маяки

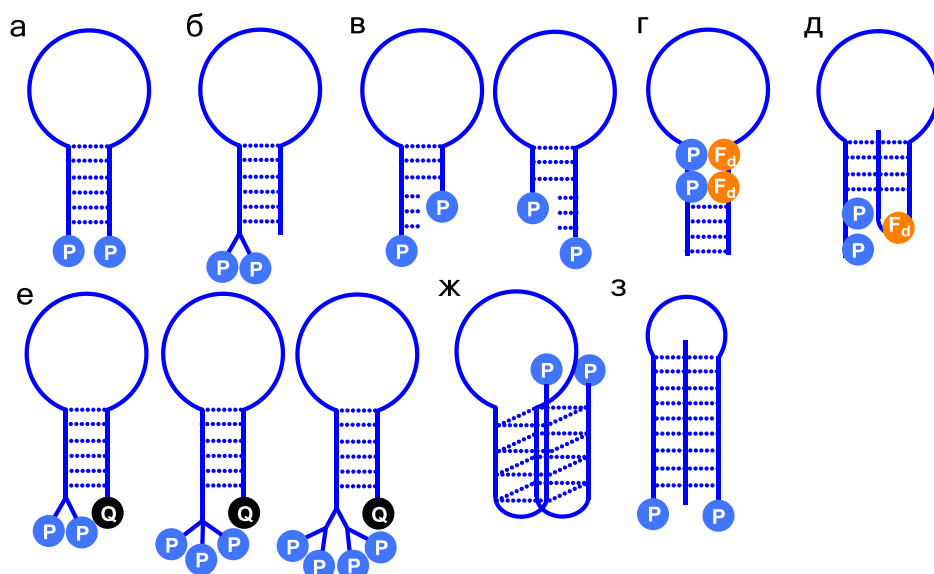


Рис. 1.16 Схематическое изображение эксимерных молекулярных маяков на основе производных пирена.

Свойство пирена образовывать устойчивый возбужденный комплекс (эксимер) также было использовано для молекулярных маяков. При сближении нескольких пиренов, энергия возбуждения, поглощенная одним из пиренов, перераспределяется между двумя молекулами, и в спектре испускания появляется дополнительная широкая полоса с длинноволновым максимумом[146]. Образование зеленого максимума флуоресценции наряду с испусканием самого пирена в голубой области при сближении легло в основу эксимерных сенсоров со структурой молекулярных маяков. Был синтезирован шпильчатый зонд с двумя остатками пирена в 5'- и 3'-концевых положениях на алкильных линкерах (**рис. 1.16а**)[147]. В закрытой форме зонда оба остатка пирена сближены, и зонд при возбуждении ультрафиолетом обладает сильной флуоресценцией с максимумом при 500 нм. При денатурации шпильки пирены расходятся, и эксимерный максимум пропадает, при этом квантовый выход испускания мономера увеличивается. Зеленая флуоресценция сменяется на синюю при титровании эксимерного молекулярного маяка комплементарной матрицей. Полученные зонды показали высокую эффективность для выявления однонуклеотидного полиморфизма на модельной матрице.

Молекулярные маяки, меченные двумя пиренами в концевых положениях, также были использованы и в последующих работах. Образование эксимерного комплекса при гибридизации с мишенью выглядит более привлекательно, нежели его распад. Реализация такого анализа, однако, заставляет исследователей прибегать к более изощренному дизайну зондов. Замыкание эксимерного зонда в шпильку при связывании с ДНК-мишенью возможно за счет образования тройной ДНК-спирали (**рис. 1.16з**)[148]. В данном случае участок, отвечающий за связывание зонда с матрицей, находится в 5'- и 3'-терминальных положениях, а не в петле, как в классических молекулярных маяках. Так, в отсутствие мишени зонд находится в негибризованном состоянии и обладает флуоресценцией мономерного пирена. При наличии комплементарной последовательности один конец зонда образует Уотсон-Криковские взаимодействия с ней, а второй – Хугстиновские. Образование тройной спирали зонда приводит к сближению пиреновых хромофоров и появлению эксимерного максимума в спектре испускания. Такие зонды показали высокую избирательность в отношении ДНК-мишеней с однонуклеотидными полиморфизмами.

Авторами [149] была предложена методика для определения однонуклеотидных полиморфизмов последовательности при каскадном усилении сигнала методом HCR. В работе использовали два шпильчатых зонда с пиренами на 5'- и 3'-концах, при этом один из пиренов присоединен к выступающему на 6 нуклеотидов концу (**рис. 1.16в**). Каждый зонд состоит из устойчивого стебля 18 пар оснований и короткой петли – 6 нуклеотидов.

После добавления матрицы к реакционной смеси, содержащей оба зонда, происходит гибридизация с одним из зондов, негибридизованный участок связывает второй зонд, и так далее. Протекает поочередное каскадное раскрытие шпилек обоих зондов, конец одного зонда вместе с пиреном сближается с другим, и происходит образование многочисленных эксимерных пар. Таким образом, единственная молекула мишени связывается с множеством зондов, приводя к высокому усилению флуоресценции зеленого диапазона и, как следствие, высокой чувствительности метода.

Пиреновый эксимер обладает предельно высоким Стоксовым сдвигом порядка 130–150 нм и большим временем жизни возбужденного состояния (~40 нс) по сравнению с обычными органическими флуорофорами (~7 нс). Эти качества делают его крайне привлекательной меткой для олигонуклеотидных зондов для детекции в стационарном и времяразрешенном режиме. Введение нескольких пиренов по 5'-положению молекулярного маяка совместно с тушителем Dabcyl на 3'-конце было изучено для обнаружения комплементарной ДНК-мишени в стационарном и времяразрешенном режимах детекции (**рис. 1.16е**)[150]. При добавлении эксимерных зондов к клеточной культуре при задержке в 60–110 нс было продемонстрировано практически полное отсекаание зеленой автофлуоресценции клеток с сохранением эксимерной флуоресценции. Данная методика позволила добиться значительного увеличения отношения полезного сигнала к фону в зеленой области спектра. Увеличение числа пиреновых остатков от двух до четырех в составе флуоресцентной метки зонда приводило к усилению эксимерного максимума по отношению к мономерному от 1,5 до 6,2 и увеличению квантового выхода флуоресценции.

Авторами работы [151] была предложена структура шпилечного зонда, меченного реагентом с двумя остатками пирена на 5'-конце без тушителя (**рис. 1.16б**). Как утверждается в работе, такой зонд обладает выраженной эксимерной флуоресценцией только в отсутствие комплементарного олигонуклеотида, находясь в форме шпильки. В то время, как при денатурации самокомплементарного участка пиреновый эксимер, находясь на одноцепочечном участке, неустойчив и наблюдается практически полное исчезновение длинноволновой полосы в спектре испускания зонда. Эксимерный зонд оказался избирательным по отношению к комплементарным мишеням с однонуклеотидным полиморфизмом. Анализ проводился при конкурентном замещении комплементарной зонду цепи при катализе специфическими катионными привитыми сополимерами, которые ускоряют реакцию замещения в дуплексе.

Группой Роберта Хэнера были разработаны несколько архитектур шпилечных зондов с полиароматическими флуорофорами и тушителями (**рис. 1.16г,д**)[152–154].

Этинильные производные пирена вводились последовательно в составе амидитов, образуя устойчивый эксимер, а в качестве тушителя были выбраны остатки перилендиимида. Являясь частью стебля, пирены и перилендиимиды упаковывались стопкой с сильным стэкингвым взаимодействием. Такие структуры приводили к чрезвычайно эффективному переносу возбуждения пирена на перилендиимид за счет образования донорно-акцепторного комплекса. Раскрытие шпильки комплементарной матрицей приводит к многократному усилению флуоресценции эксимера и высокой чувствительности зонда.

Принцип работы эксимерного молекулярного маяка был использован и для детектирования мишеней ненуклеозидной природы. 15-звенный тромбиновый аптамер с двумя пиреновыми хромофорами на концах в присутствии ионов калия образует стабилизированный G-квадруплекс (рис. 1.16ж). Остатки пиренов при этом сближаются с образованием эксимерной флуоресценции. Такой зонд применили в работе [155] для определения K^+ в миллимолярной концентрации в присутствии Na^+ . Кроме того, G-квадруплекс меченный пиренами использовался в качестве рН-чувствительного сенсора [156,157].

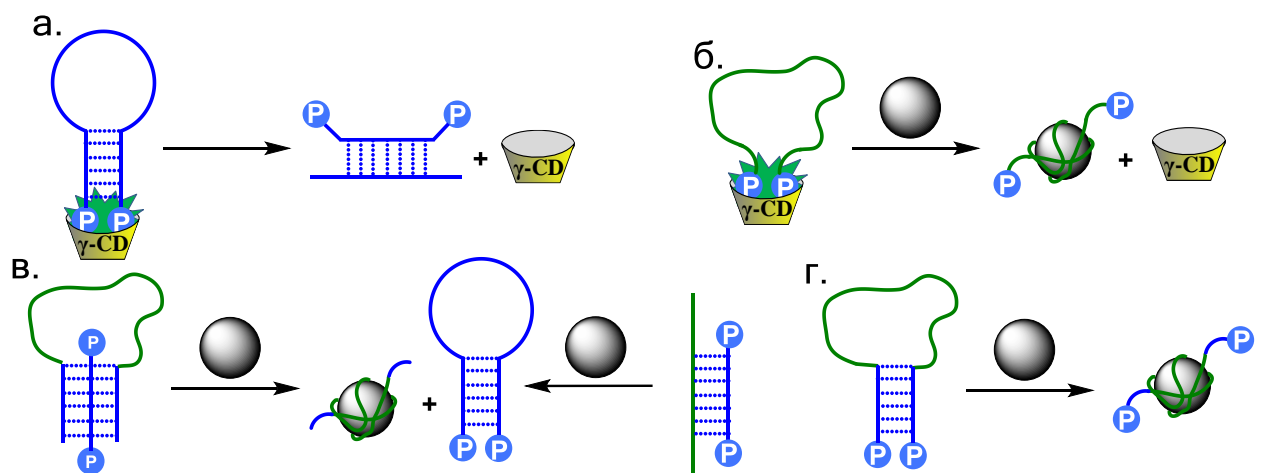


Рис. 1.17 Схематическое изображение шпильчатых аптамерных сенсоров, меченных двумя пиренами.

Группой под руководством Вэйонг Тан опубликован ряд работ [158,159], в которых представлены различные аптамерные сенсоры с пиреновой парой. В работе [160] к аптамеру по концам были добавлены две комплементарные последовательности от 3 до 5 нуклеотидов каждая (рис. 1.17г). При связывании белкового фактора роста, выделенного из тромбоцитов, аптамер меняет свою конформацию, концевые участки зонда образуют дуплекс, сближая пиреновые флуорофоры. Так, в присутствии аптамер-связывающего пептида образуется шпильчатая структура зонда с устойчивой эксимерной флуоресценцией. Большое время жизни возбужденного состояния эксимера позволило проводить анализ на клеточных культурах с времяразрешенной детекцией

флуоресцентного сигнала. Позже был разработан подход для стабилизации эксимера на концах шпилечных зондов посредством включения его во внутреннюю полость γ -циклодекстрина (**рис. 1.17а,б**)[161,162]. Отмечается, что за счет гидрофобных взаимодействий супрамолекулярного комплекса циклодекстрин/эксимерный зонд, возможно повысить отношение полезного сигнала к фоновой флуоресценции для зондов даже без концевой самокомплементарной участка. При связывании с комплементарным олигонуклеотидом или за счет аптамерного взаимодействия конформация цепи зонда меняется, высвобождая пирены из полости циклодекстрина с разрушением эксимера. Несмотря на всю привлекательность эксимерных аптасенсоров для обнаружения неолigonуклеотидных мишеней, дизайн и оптимизация аптамерного участка и стебля зонда довольно трудоемкий процесс, который необходимо осуществлять для каждой отдельной мишени. В двух работах была предложена структура зонда, при которой последовательность аптамера взаимодействует с эксимерным молекулярным маяком (**рис. 1.17в**). За счет конкурентного взаимодействия аптамера с мишенью высвобождается зонд, который переходит в шпилечную форму. В одном варианте зонд образует линейный дуплекс с последовательностью аптамера[163], а в другом гибридизован в тройной спирали со шпилечным аптамером[164].

1.3.1.5. Конъюгаты молекулярных маяков с проникающими пептидами

Использование молекулярных маяков для внутриклеточной визуализации позволяет добиться повышенной избирательности при рациональном дизайне в сравнение с линейными мечеными олигонуклеотидами. Однако проникновение олигонуклеотидных зондов через клеточную мембрану крайне неэффективно, и необходимо прибегать к дополнительным приемам для их доставки внутрь живой клетки. Помимо стандартных методов для липосомной трансфекции на основе катионных липидов и электропарации, для активного внутриклеточного транспорта были созданы конъюгатов молекулярных маяков с пептидами. Было продемонстрировано несколько различных подходов по связыванию молекулярных маяков с пептидами: а) ковалентное связывание терминального цистеина с малеимидом в составе зонда, б) образование дисульфидной связи (расщепляемый внутри клетки линкер), в) конъюгаты молекулярного маяка и пептида с биотином, связанные через стрептавидин. Конъюгаты зондов с ТАТ-пептидом показали высокую проникающую способность и эффективность для прокрашивания внутриклеточной РНК[20].

1.3.2. Смежные зонды

1.3.2.1. Смежные зонды с переносом энергии

Смежные зонды представляют собой два отдельных олигонуклеотида, которые гибридизуются с НК-матрицей в соседних положениях, при этом 5'-конец одного и 3'-конец другого зонда мечены донором и акцептором флуоресценции. При сближении обоих флуорофоров на единой НК-матрице происходит перенос энергии возбуждения от донора к акцептору. В отсутствие мишени в спектре испускания при возбуждении донорного флуорофора присутствует только его флуоресценция, а при сближении, в идеальном случае, его полоса полностью пропадает и появляется флуоресценция акцептора. Первые работы, в которых представлены смежные зонды с донорным и акцепторным флуорофорами, были опубликованы еще в 1980-х годах[165]. В сравнении с молекулярными маяками смежные зонды не обладают склонностью к ложноположительным сигналам, поскольку вероятность неспецифического связывания совместно обоих зондов и сближения флуорофоров незначительна. При низкой концентрации двух зондов в свободном состоянии, вклад излучательного и безызлучательного переноса энергии нивелирован в суммарном спектре испускания. Эти качества смежных зондов оказываются полезными, например, при внутриклеточной визуализации РНК мишеней[166,167]. Смежные зонды, однако, не лишены некоторых недостатков, влияющих на соотношение полезный сигнал/фон. Для эффективного переноса энергии необходимо максимальное перекрытие спектра испускания донора и поглощения акцептора, при этом спектр флуоресценции донора может накладываться на флуоресценцию акцептора, приводя к завышенному фону. Неудачный подбор флуоресцентных маркеров может привести к невыраженному переносу энергии и низкому усилению флуоресцентного сигнала при связывании. При возбуждении флуоресценции донора, акцептор не должен поглощать возбуждающее излучение. Кроме того, избирательность смежных зондов в отношении НК-последовательности уступает молекулярным маякам ввиду отсутствия шпилечной структуры. Последовательности обоих зондов должны быть подобраны таким образом, чтобы их сродство по отношению к мишени было одинаковыми, и они не конкурировали друг с другом. Оптимальным расстоянием для эффективного переноса энергии между донором и акцептором является от 1 до 5 нуклеотидов[168]. Если в случае молекулярных маяков улучшение характеристик зонда в основном достигалось варьированием структуры зонда или введением нескольких красителей различной природы, в смежные зонды вводили

донорный и акцепторный флуорофоры различной природы для улучшения отношения сигнал/фон.

1.3.2.2. Смежные зонды с тремя флуорофорами

Увеличение Стоксова сдвига между донором и акцептором флуоресценции смежных зондов по аналогии с молекулярными маяками достигалось введением дополнительного флуорофора в один из зондов[169]. Один зонд содержит FRET пару донор – FAM и акцептор – TAMRA, а другой акцептор – Cy5. TAMRA поглощает энергию возбуждения от FAM и переносит на цианиновый краситель Cy5. Возбуждение FAM происходит при излучении длинной волны 488 нм, а испускание Cy5 с максимумом 670 нм. Несмотря на сложную конструкцию таких зондов отношение сигнал/фон оказалось ниже обычных зондов с двумя красителями примерно в 2 раза. Очевидно, квантовый выход флуоресценции при каскадной передаче энергии с FAM на Cy5 значительно уменьшается за счет не 100%-ного переноса энергии возбуждения и частичной ее диссипации и излучения донорами.

1.3.2.3. Экцимерные смежные зонды

Образование пиренового эксимера использовалось в смежных зондах. Два олигонуклеотида, меченные одиночными пиренами при сближении на комплементарной матрице способны образовывать комплекс с выраженной зеленой полосой в спектре испускания. При этом происходит значительное увеличение Стоксова сдвига >100 нм. Устойчивость эксимера и, соответственно, интенсивность флуоресценции в зеленой области, сильно зависит от расстояния и перекрывания орбиталей пиренов.

Принцип смежных зондов, меченных пиреновыми фрагментами, был предложен группой Эбата с соавт.[170,171] Зонды применялись для обнаружения 16S рРНК в концентрации 10 нМ. Авторы утверждают, что чувствительность пиреновых зондов оказалась на один порядок ниже в сравнении с ксантоновыми красителями на основе флуоресцеина. Они связывают это с низким квантовым выходом эксимерной флуоресценции - $5,6\% \pm 0,7\%$. Для снижения тушения флуоресценции эксимера авторы добавили до 40% ДМФА к гибридизационному буферу, что, однако, не позволяет использовать такие зонды для детекции в кПЦР или в живых клетках.

Эффект тушения флуоресценции пирена в составе зондов в основном вызван взаимодействием с ближайшими нуклеозидами[172]. В работе [173] была предложена структура мономерного аналога дезоксирибозы с остатком пирена, соединенным гликозидной связью. Реагент вводился в зонды по 5'- и 3'-концам. При гибридизации за счет жесткой фиксации пиренов в стэке флуоресценция эксимера становилась более

выраженной. В работе представлен детальный анализ влияния длины и состава комплементарной матрицы на стабильность эксимерной флуоресценции. Предел обнаружения был достигнут 4 нМ концентрации матрицы в отсутствие органического растворителя.

Поскольку пиреновый эксимер в составе олигонуклеотидных зондов обладает высоким временем жизни, смежные зонды с пиреновыми хромофорами были протестированы для определения специфической РНК-мишени, которую добавляли отдельно к клеточному экстракту во время-разрешенном варианте детекции[174]. Время задержки составляло 30–150 нс, при этом увеличение отношения сигнал/фон достигало 10-кратного в присутствии 100 нМ концентрации мишени. Несмотря на успешное отсекание фоновой флуоресценции эндогенных флуорофоров, чувствительности эксимерных зондов оказалось недостаточно для визуализации РНК последовательностей внутри живой клетки.

В состав двух разделенных зондов также вводились хромофоры различной природы, образующие эксиплекс. Один хромофор представлял собой производные пирена, а второй – аминафталина. Такие комплексы, однако, менее стабильны чем пиреновый эксимер, а смещение флуоресценции в длинноволновую область выражено слабее. Группа Елены Биченковой с соавт. опубликовала ряд работ по изучению стабильности эксиплекса в составе смежных зондов[175]. На образование комплекса оказывает влияние длина и жесткость линкера, природа непиреновой компоненты[176] и наличие органического растворителя – трифторэтанола[177]. Зонды с разным составом эксиплекса/эксимера были протестированы для детектирования комплементарной матрицы *in situ*, продукта ПЦР и плазмидной ДНК. Для эксиплексных зондов предел обнаружения кДНК методом ПЦР составил более чем на порядок выше, чем для эксимерных зондов ~400 нМ.

1.3.2.4. Смежные зонды со структурой молекулярных маяков

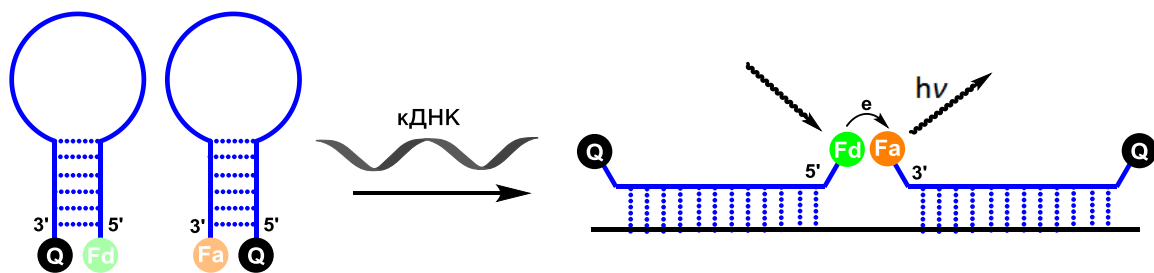


Рис. 1.18 Смежные молекулярные маяки, меченные донорным и акцепторным флуорофорами.

Для повышения чувствительности олигонуклеотидных зондов по отношению к эндогенным мишеням необходимо снижать фоновую флуоресценцию и повышать специфичность, что приводит к снижению ложноположительных сигналов. Для этого возможно комбинировать принцип работы смежных зондов с FRET-парой и вторичную структуру молекулярных маяков с тушителями на противоположных концах зондов. В шпильчатой конформации флуоресценция загашена, а при гибридизации на одной мишени помимо разгорания флуоресценции происходит еще перенос энергии от донора к акцептору. Один зонд содержит флуорофор на 5'-конце и тушитель на 3'-конце, а другой, соответственно, в обратном варианте. В работе [178] прибегли к такому подходу для оценки локализации мРНК в ооцитах. Применяли два зонда, имеющие одинаковую специфичность к РНК-мишени, меченные донором TAMRA и акцептором Texas red. Флуоресценция обоих зондов, распределенных внутри клетки, была обозначена как фоновый сигнал, а флуоресценция Texas red при возбуждении TAMRA отвечала за область локализации мишени.

Позже эта технология пользовалась популярностью для визуализации РНК внутри живых клеток. Ганг Бао с соавт.[119] применяли такой же подход для оценки количества мРНК, ответственной за синтез сурвивина в клеточных культурах HDF и MIA PaCa-2. В качестве флуорофоров были выбраны два цианиновых красителя с узкими полосами флуоресценции Cy3 и Cy5. Молекулярные маяки с переносом энергии показали чувствительность в отношении РНК-мишени почти в 2 раза выше в сравнении с одним зондом. Сравнение с методом ПЦР в реальном времени также определило приоритет по чувствительности визуализации с использованием смежных молекулярных маяков.

Эта же группа позже определяла полиаденилированные мРНК человека, отвечающие за трансляцию эндотелиальной синтазы оксида азота[179]. Один зонд содержал последовательность, комплементарную 3'-концу мРНК, а другой - политимидиновую последовательность в петле. При совместном введении обоих молекулярных маяков в клетки эндотелия пупочной вены человека удалось дать сравнительную оценку зрелой мРНК и полиаденилированной. Таким образом, удалось выявить экспрессию гена, ответственного за синтазу оксида азота эндотелия.

1.3.2.5. Смежные зонды для времязрешенной детекции люминесцентного сигнала

Поскольку для внутриклеточной визуализации необходимо учитывать не только фоновую флуоресценцию зондов, но и в значительной мере автофлуоресценцию клеток, часто прибегают к флуорофорам с большим временем жизни, чем у триптофана и др. внутриклеточных флуорофоров. Уникальным классом «долгоживущих» источников

излучения являются комплексы некоторых переходных элементов, они обладают чрезвычайно большим временем жизни возбужденного состояния вплоть до нескольких мкс, что превышает время жизни флуоресценции органических молекул в несколько сот раз. Детекция флуоресценции с задержкой после возбуждения в несколько сотен нс позволяет почти полностью отсекаать автофлуоресценцию эндогенных хромофоров, повышая тем самым отношение сигнал/фон. Хелатированные катионы переходных металлов проигрывают органическим флуорофорам по молярным коэффициентам поглощения и квантовым выходам флуоресценции; кроме того, для них, так же как и для органических молекул, характерно фотовыцветание, особенно при сильных световых потоках. Подобный принцип используют для зондов с пиреновым эксимером, поскольку он обладает промежуточным временем жизни между неорганическими и органическими люминофорами.

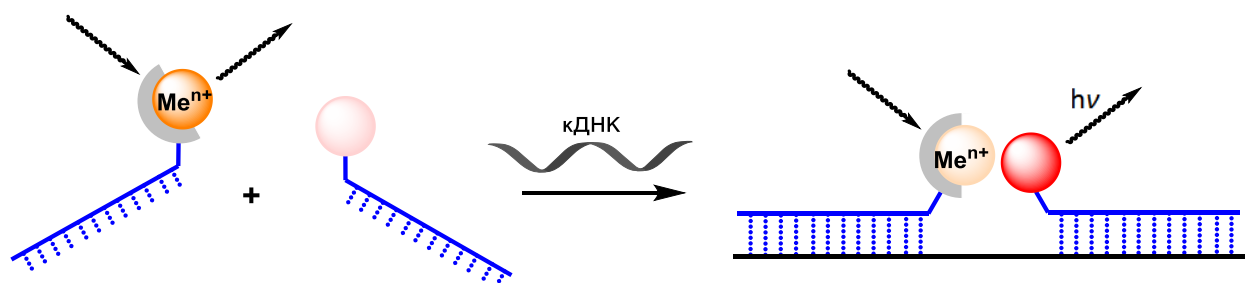


Рис. 1.19 Схематическое изображение смежных зондов с хелатированным донорным люминофором.

Комплексы Ru^{2+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} могут выступать в качестве донорного люминофора, а органический краситель - акцептором. Перенос энергии от металла в триплетном состоянии на синглетный флуорофор является запрещенным, что приводит к длительному времени жизни люминесценции. Такой перенос называют спин-запрещенный резонансный перенос энергии (SFRET - spin-forbidden resonance energy transfer). В клеточной среде, отношение сигнал/фон для таких зондов увеличивается пропорционально времени задержки между возбуждением хелатированного люминофора и детектированием флуоресценции акцептора, вплоть до полного отсекаания автофлуоресценции клеток.

Таблица 1.3 Донорно-акцепторные пары в составе смежных зондов на основе люминофоров переходных элементов.

#	Донор флуоресценции	Акцептор флуоресценции	Ссылка
1)			[175]
2)			[180]
3)			[181]
4)			[182]

Перенос энергии от Ru^{2+} на Os^{2+} был продемонстрирован в работе [175]. Два зонда с хелатированными металлами гибридизовали с матрицей для определения однонуклеотидных полиморфизмов. В более поздних публикациях описываются зонды с переносом от хелатированных металлов на органические красители. Это позволяет, сохранив спектр испускания органического флуорофора, увеличить его время флуоресценции и Стоксов сдвиг. При этом коэффициенты молярного поглощения красителей в среднем на один порядок выше катионов металла, таким образом испускание донора практически полностью пропадает в гибридизованном состоянии. Группа Шинжи Суэда с соавт.[180,181] ковалентно вводили хелатирующие лиганды в стрептавидин, а

олигонуклеотидный зонд модифицировали биотином. За счет аффинного взаимодействия биотин/стрептавидин удалось ввести несколько хелатированных флуорофоров Eu^{3+} и Tb^{3+} в зонд. В качестве акцепторов выступали цианиновые красители Cy3 и Cy5 с высокими коэффициентами молярного поглощения 160000 и $250000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Только через 5 лет был предложен более простой вариант, при котором комплекс $\text{Ru}(\text{bpy}')(\text{DIP})_2^{2+}$ ковалентно вводили в 3'-положение одного зонда, а Cy5 - по 5'-концу другого[182].

Хелатирование некоторых переходных металлов лигандами может приводить к появлению полос люминесценции в спектре испускания. Это свойство также применялось в смежных зондах для усиления флуоресценции при ДНК-темплатном хелатировании некоторых катионов *d*-элементов. При сближении двух лигандов на НК-матрице, они хелатируют ион металла образуя устойчивый комплекс – флуорофор, приводя к усиленной флуоресценции при связывании с детектируемой последовательностью. Излучение, поглощаемое одним из лигандов, передается на катион металла и переносится вторым лигандом-антенной с излучением в видимой области. Когда метал хелатирован только в составе одного из зондов этого переноса энергии не происходит.

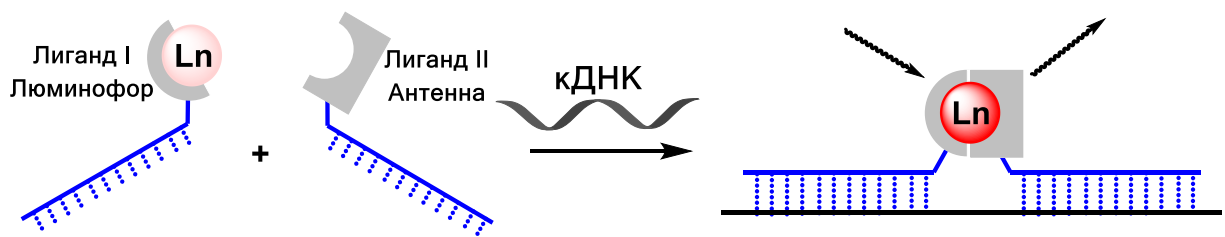


Рис. 1.20 Принцип работы смежных зондов с совместным хелатированным катионом лантаноида.

Первая работа, описывающая смежные зонды со времяразрешенной техникой регистрацией флуоресценции описана Осером и Валетом[183]. Они использовали производное 4-аминосалициловой кислоты, полученное восстановительным аминированием из диальдегида, в качестве донора и комплекс Tb^{3+} в качестве акцептора при задержке времени детекции более 400 нс. При сближении на НК-матрице образуется флуоресцентный комплекс с испусканием в голубой области $>435 \text{ нм}$ и временем жизни 1,58 мкс. Позже принцип гибридизации двух лигандных зондов на общей мишени был заимствован в ряде работ по обнаружению аналитов разной природы. Начиная с 1990 года можно отследить эволюцию хелатных люминофоров, которые были использованы в смежных зондах (**рис. 1.21**)[184–195].

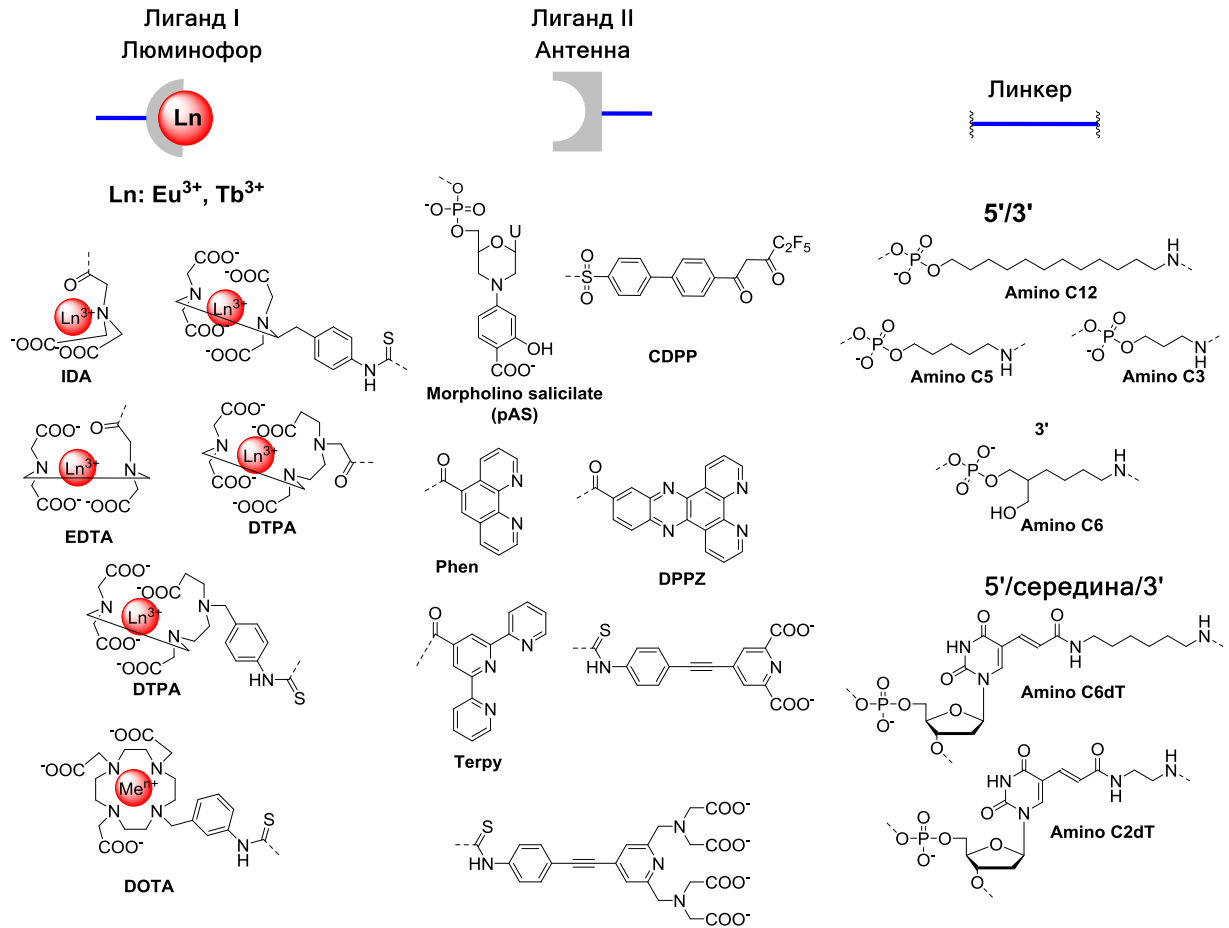


Рис. 1.21 Хелатированные ионы, лиганды-антенны и вариант крепления лиганда к олигонуклеотидному зонду.

1.3.2.6. Зонды с матричным лигированием

Для увеличения флуоресцентного сигнала при связывании смежных зондов с мишенью может служить химическая реакция между двумя субстратами на концах олигонуклеотидных зондов. ДНК-матричный синтез и лигирование распространяется на множество типов реакций и приложений, в том числе не имеющих отношения к флуоресцентным ДНК-зондам. Данная глава посвящена смежным зондам, при сближении которых происходит высвобождение или образование флуоресцентного красителя. Условно реакции можно разделить на три типа: конденсация двух субстратов с образованием флуорофора, высвобождение тушителя из зонда, деблокирование флуорофора. В ходе каждого из типов реакций происходит увеличение квантового выхода флуоресценции, которая регистрируется при связывании зондов с НК-аналитом.

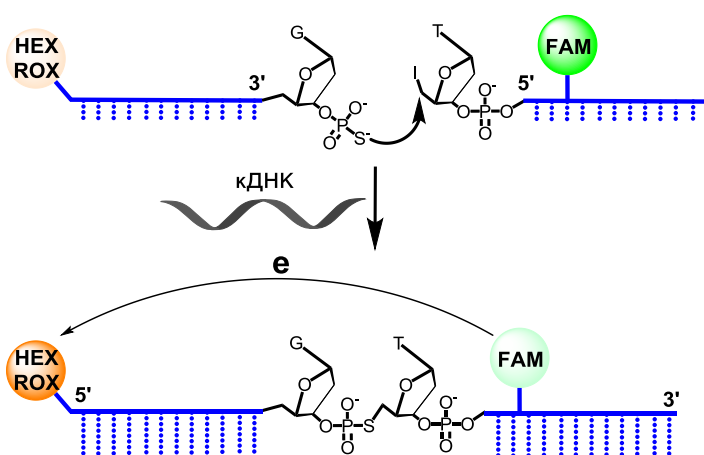


Рис. 1.22 Принцип матричного лигирования при алкилировании 5'-йодтимина 3'-тиофосфатом.

Впервые неферментативное лигирование флуоресцентных зондов было предложено группой Эрика Кула[196]. Для лигирования использовалась реакция 3'-тиофосфатного остатка с 5'-йодотимидином в составе двух коротких олигонуклеотидов (рис. 1.22). Оба зонда были помечены донором или акцептором флуоресценции. Перенос энергии происходил с FAM на один из двух ксантовых красителя ROX или HEX, в зависимости от комплементарной цепи – дикого типа и мутантной. Лигирование происходило на комплементарной матрице с образованием фосфотиоэфирной связи, полученная последовательность зонда длиной 20 нуклеотидов имела высокую температуру плавления с дуплексом. Один зонд с FAM и два конкурирующих с однонуклеотидными заменами, меченные ROX и HEX, тестировались для определения полиморфизма модельного олигонуклеотида в изотермическом и термоциклическом варианте. В данном случае НК-матрица только катализирует лигирование зондов, ее концентрация требуется значительно ниже концентрации зондов.

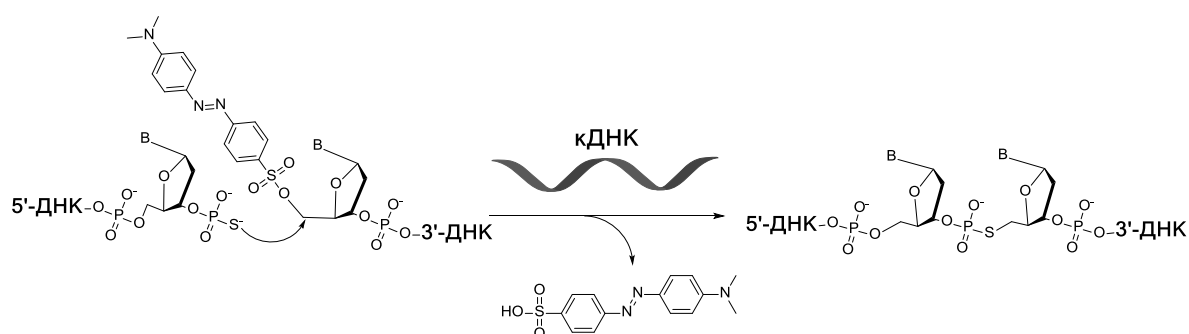


Рис. 1.23 Фосфотиоат-сульфонатное лигирование с высвобождением тушителя Dabsyl.

Позже в нескольких работах было предложено использовать смежные зонды с отщепляемым тушителем флуоресценции Dabsyl[197]. Один зонд содержит 3'-тиофосфатную группу, а другой мечен флуорофором, как правило, FAM и 5'-тушителем на гибком расщепляемом линкере с сульфонатной группой. При гибридизации двух

зондов происходит нуклеофильная атака по типу S_N2 тиофосфатом α -углеродного атома при сульфатной группе. Dabsyl-сульфоная кислота выступает в качестве уходящей группы, отщепляясь от зонда, резонансный перенос энергии с FAM пропадает и происходит усиление флуоресценции (рис. 1.23). Такие зонды могут быть использованы для мультисканальной детекции нескольких флуорофоров в составе разных олигонуклеотидных последовательностей[198,199]. Областью применения таких зондов является визуализация РНК в живых клетках[200].

Стоит отметить, что сульфаты недостаточно стабильны в водных растворах, поэтому отщепление тушителя может происходить не только при атаке тиофосфата, но и других нуклеофилов, например эндогенной природы. Эта особенность, а также возможная недостаточная “затухенность” флуоресценции зонда могут провоцировать ложноположительные результаты при клеточной визуализации. Для снижения фонового сигнала и увеличения чувствительности зондов было предложено добавить в зонды с матричным отщеплением тушителя дополнительный акцепторный флуорофор[201]. В данном подходе энергия возбуждения переносится с донора FAM при отщеплении тушителя на акцептор Су5 и регистрируется флуоресценция в красном диапазоне. Зонды использовались для флуоресцентной цитометрии многокопийных РНК. Чувствительность зондов, однако, не позволяет определить низкокопийные РНК-мишени в живой клетке, а сама НК-промотируемая реакция занимает 3–6 ч, что недостаточно для быстрого проведения анализа. Для ускорения протекания реакции были разработаны химические методы введения нуклеофилов большей силы в 3'-конец зонда, как альтернатива тиофосфату. Так, использование дитиофосфата и тритиофосфата для матричного отщепления тушителя снизило время проведения реакции в 2–4 раза, а отношение сигнал/фон при этом увеличилось вдвое[202].

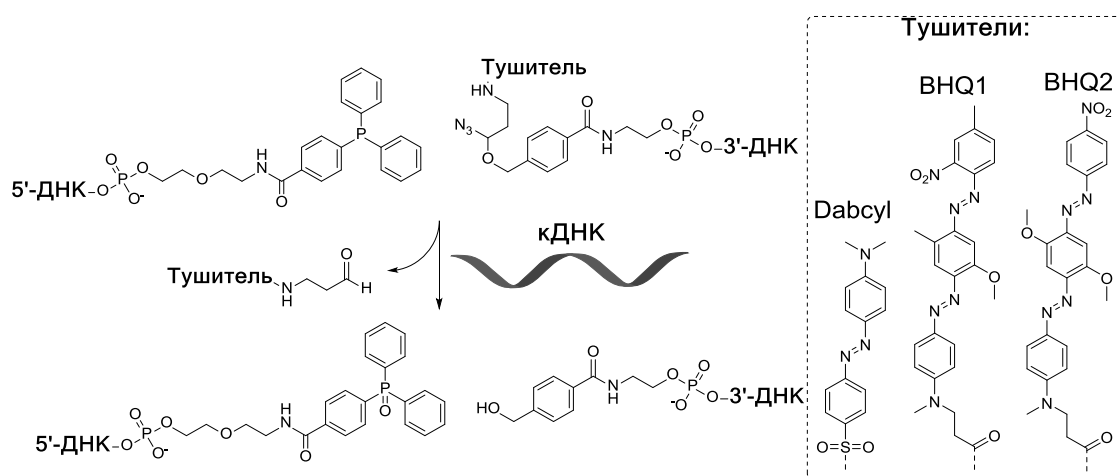


Рис. 1.24 Реакция Штаудингера с фрагментацией α -азидометилового эфира и высвобождением темного тушителя.

Появление биоортогональных реакций не осталось незамеченным и для смежных зондов с высвобождением хромофора. Реакция Штаудингера стала универсальной альтернативой расщеплению сульфонов. В основе лигирования по Штаудингеру лежит реакция между трифенилфосфином и азидогруппой. Если реакция протекает между α -азидоэфирами и трехвалентным фосфором, происходит расщепление эфирной связи с выделением спирта и карбонильной компоненты. Лигирования двух зондов при этом не происходит, а реакция не ингибируется образующимся длинным олигонуклеотидным продуктом. В более поздних работах группа Эрика Кула разработала расщепляемый линкер, содержащий α -азидоэфирную группу, через который тушитель соединялся с терминальным положением зонда (рис. 1.24)[203]. Второй зонд содержит трифенилфосфин, селективно восстанавливающий азидогруппу. Реакция Штаудингера протекает быстрее, селективно и без побочных продуктов. Скорость протекания анализа увеличивается, а фоновый сигнал снижается.

Образование гемицианинового флуорофора при смежном лигировании двух зондов было предложено в качестве альтернативы отщеплению тушителя[204]. Флуоресцентный краситель образуется в ходе конденсации *N*-метилиндолина с *n*-диалкиламинобензальдегидом в составе двух зондов. Реакция протекает при сближении двух концов олигонуклеотидов при катализе высоконуклеофильными диаминами. В результате фоновая флуоресценция практически сведена к нулю. Далее этот подход не получил развития и не был применен для внутриклеточной визуализации, кроме того, стоит сказать о высокой активности карбонильной группы в составе одного из зондов по отношению к эндогенным нуклеофилам. Зонды с отщепляемым тушителем использовались для визуализации бактериальных 16S рРНК в двухканальном варианте для двух последовательностей[204–206]. В модельных экспериментах смежными зондами определяли двухцепочечные последовательности за счет образования тройной спирали с зондами[207].

Для снижения фоновой флуоресценции и увеличения контрастности смежных зондов были разработаны реагенты, содержащие два азобензольных тушителя для введения их в зонды. В ходе отщепления обоих азокрасителей усиление флуоресценции происходит с большей интенсивностью. Подход был отработан на тиофосфат-сульфонатном лигировании[208] и реакции Штаудингера[209]. В обоих случаях отношение сигнал/фон оказалось выше для зондов с двойными тушителями. Зонды с тиофосфат-сульфонатным лигированием использовались для прокрашивания 16S рРНК в бактериальных клетках. Это позволило оптимизировать структуру линкера, несущего

отщепляемые тушители и оптимизировать структуру зондов с улучшением контрастности изображения.

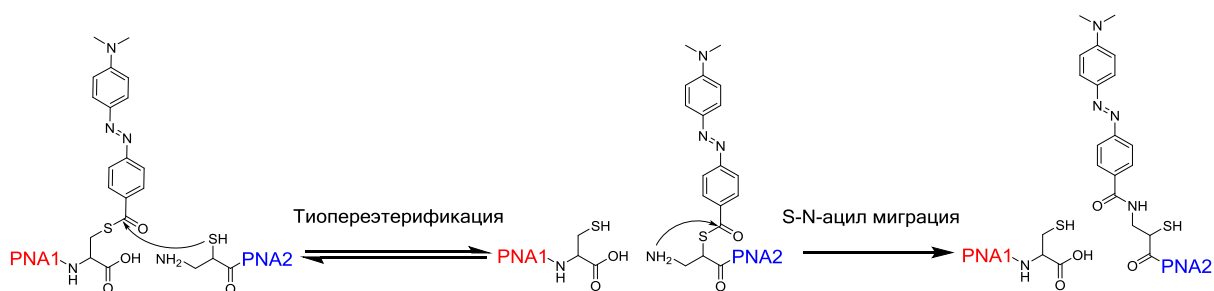


Рис. 1.25 Миграция Dabsyl с одного цистеинового остатка на другой в составе PNA зондов.

Том Гроссман и Оливер Зайц разработали способ переноса тушителя с одного зонда на другой [210,211]. Зонды представляют собой две коротких последовательности (7 и 10 нуклеиновых оснований) с PNA каркасом. Смежные концы зондов содержат C-концевой цистеин, связанный с Dabsyl через тиоэфирную связь, а N-конец другого содержит свободный остаток изоцистеина. При сближении этих групп каскадно протекает перетиоэтерификация, затем S-N миграция Dabsyl с образованием стабильной амидной связи (**рис. 1.25**). Реакция протекает на комплементарной матрице автокаталитически. В работах тушитель мигрировал с FAM-меченного зонда на зонд с TAMRA, приводя к усилению флуоресценции одного красителя и подавлению другого. Кроме того, авторы предложили структуру зондов, в которых мигрирует пирен и сближается со вторым пиреном, образуя эксимер с испусканием в зеленой области [211].

1.3.2.7. Матричная активация флуорофора в составе смежных зондов

Усиление флуоресценции смежных зондов может достигаться не только отщеплением тушителя, но и некоторыми защитными группами в составе флуорофора, приводя к увеличению квантового выхода флуоресценции. При таком подходе азобензольный тушитель флуоресценции исключается из структуры зонда, а усиление сигнала связано исключительно с изменением структуры самого флуоресцентного красителя. Так, один зонд должен содержать защищенный флуорофор, а другой функциональную группу атомов, способствующую деблокированию хромофора.

Впервые высвобождение красителя при гибридизации смежных зондов было продемонстрировано на гидролизе *n*-нитрофенилового сложного эфира при катализе гистамином [212]. В ходе реакции выделяется окрашенный *n*-нитрофенолят анион в присутствии каталитического количества комплементарной матрицы. Недостатками данного метода явилось слабая чувствительность детекции фенольного субстрата по поглощению в видимой области спектра. Далее этот принцип был освоен и для флуоресцирующих красителей. Та же группа авторов позже предложила использовать

производное 7-гидроксикумарин в качестве субстрата вместо *m*-нитрофенола[213,214]. В качестве зондов выбрали короткие пептидно-нуклеиновые кислоты для увеличения аффинности к мишени; скорость отщепления кумарина оказалась существенно ниже скорости высвобождения акцепторного *m*-нитрофенола. Несмотря на это, чувствительность меченных кумарином зондов повысилась. Позже было показано, что присоединение гистидина и 7-алкоксикумарина в 5 положения урацильных остатков увеличило скорость отщепления флуорофора при гибридизации[215]. Это обусловлено тем, что при такой модификации функциональные группы располагаются в большой бороздке, в отличие от присоединения через гибкие линкеры к концам PNA-зондов.

В более поздних работах были предложены альтернативные способы деблокирования флуорофоров в составе смежных зондов. Нуклеофильное замещение по S_NAr типу практически не рассматривалось, очевидно, ввиду неспецифичности протекания, особенно в физиологических условиях. Вместо отщепления флуорофора от олигонуклеотидной последовательности использовали введение защитных групп, подавляющих флуоресценцию красителя, и отщепляемых при сближении со вторым зондом на матрице. Большую популярность, так же как и в случае отщепления тушителей от зондов, приобрела реакция Штаудингера. Лигирование по Штаудингеру–Бертоцци (в отличие от одноименной реакции) приводит к образованию амидной связи в ходе реакции 2'-карбокситрифенилфосфина с алифатическими азидами по следующему механизму:

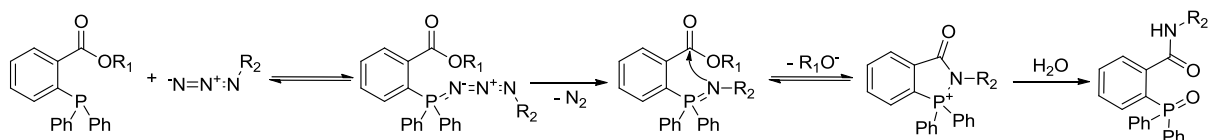


Рис. 1.26 Реакция в основе лигирование по Штаудингеру-Бертоцци с образованием ковалентной амидной связи.

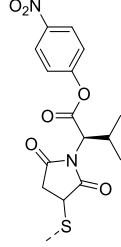
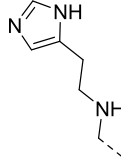
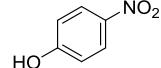
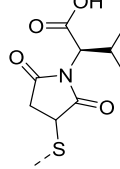
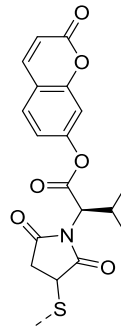
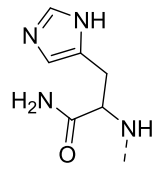
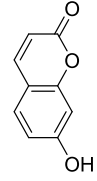
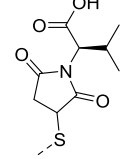
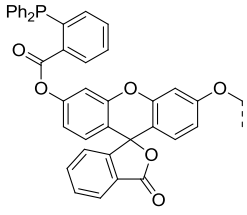
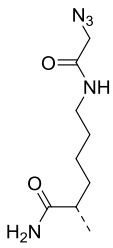
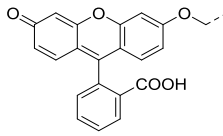
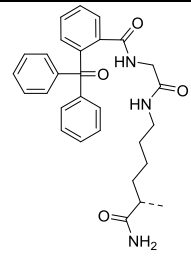
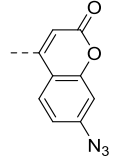
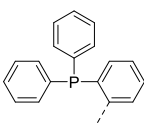
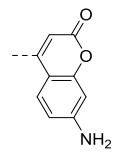
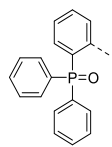
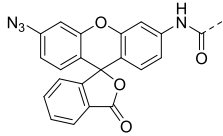
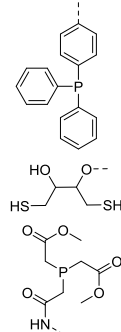
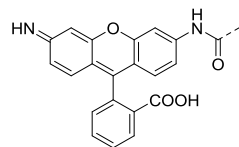
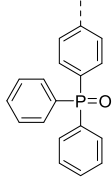
Впервые лигирование по Штаудингеру было предложено группой К. Бертоцци [216,217], а для смежных зондов его использовали для деблокирования производного флуоресцеина, защищенного *O*-трифенилфосфинкарбоксилатом[218]. Позже, ввиду высокой инертности в качестве защитных групп, подавляющих флуоресценцию, применялись различные азидопроизводные. Введение остатка трифенилфосфина на линкере к смежному зонду также методологически универсальнее и проще в исполнении, чем в состав красителя. Арилазиды при обработке трифенилфосфином превращаются в ароматические амины, азидометильная защитная группа удаляется с образованием свободной гидроксильной группы. В качестве защищенных субстратов наиболее популярны производные ксантеновых красителей и кумаринов (табл. 1.4). Флуоресцеин и 7-гидроксикумарин защищают азидометильной группой, а в родамины и 7-аминокумарин

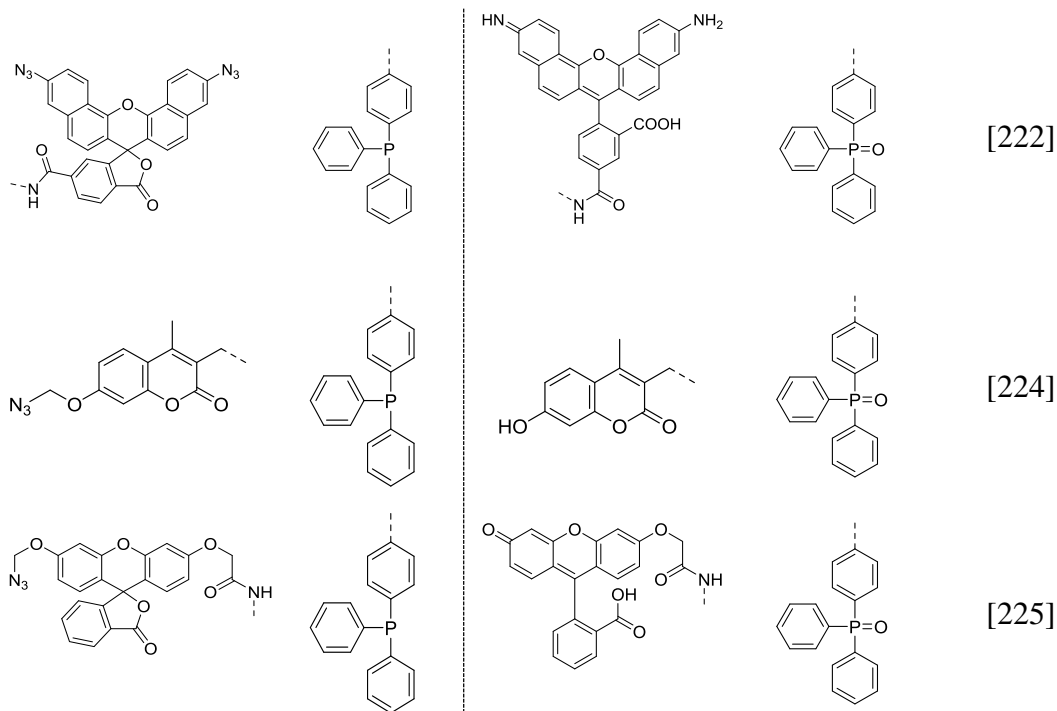
на место аминогруппы вводят азид. При этом для ксантеновых красителей характерна хиноидная таутомерная лейкоформа, а при удалении азидов происходит перераспределение двойных связей бензольного кольца. Группы Хироши Абе и Николаса Винсингера практически одновременно предложили использовать родамин 123 с азидом вместо аминогруппы как субстрат для реакции Штаудингера в составе смежных зондов[219–221], а позже и его батохромный аналог нафтородамин[222]. 7-Азидокумарин в таких реакциях выступает в качестве защищенного 7-аминокумарина[223]. Удаление азидометильной группы было продемонстрировано на 7-азидометоксикумарине[224] и азидометильном производном флуоресцеина[225] с выделением свободных фенольных флуорофоров.

Кроме того, арилазиды подвержены фотодеструкции с высвобождением реакционноспособных арилнитренов, которые в присутствии восстановителей образуют соответствующие ароматические амины. Группа Дэвида Лиу разработала способ мягкого фотовосстановления ароматических азидов в составе олигонуклеотидной последовательности комплексами Ru^{2+} в присутствии аскорбиновой кислоты или NADPH[226]. Этот принцип использовался для фотоактивируемых флуоресцентных зондов. Николай Винсингер с соавт. предлагает в качестве альтернативы трифенилфосфину как восстановителя использовать комплекс $[Ru^{II}(bpy)_2(phen)]$ в составе PNA зондов[227]. Субстратами для фотовосстановления выступали 7-азидокумарин и линкер, подверженный фотодеструкции, соединяющий зонд с производным родамина[228]. Позже смежные зонды с Ru^{2+} и фоторасщепляемым линкером были успешно апробированы для внутриклеточной визуализации РНК-мишеней[227]. Кроме фотовосстановления азидогруппы группа Винсингера применила 1-(2-нитрофенил)этиловый эфир в качестве фотоактивной компоненты линкера[229]. Производное родамина, соединенное с зондом через такой линкер, отделялось при сближении с фотосенсибилизатором – тиоксантоном и облучении фиолетовым светом (405 нм). В основе отщепления лежит автоокисление о-нитробензиловых эфиров при возбуждении их светом в о-нитрозобензальдегиды.

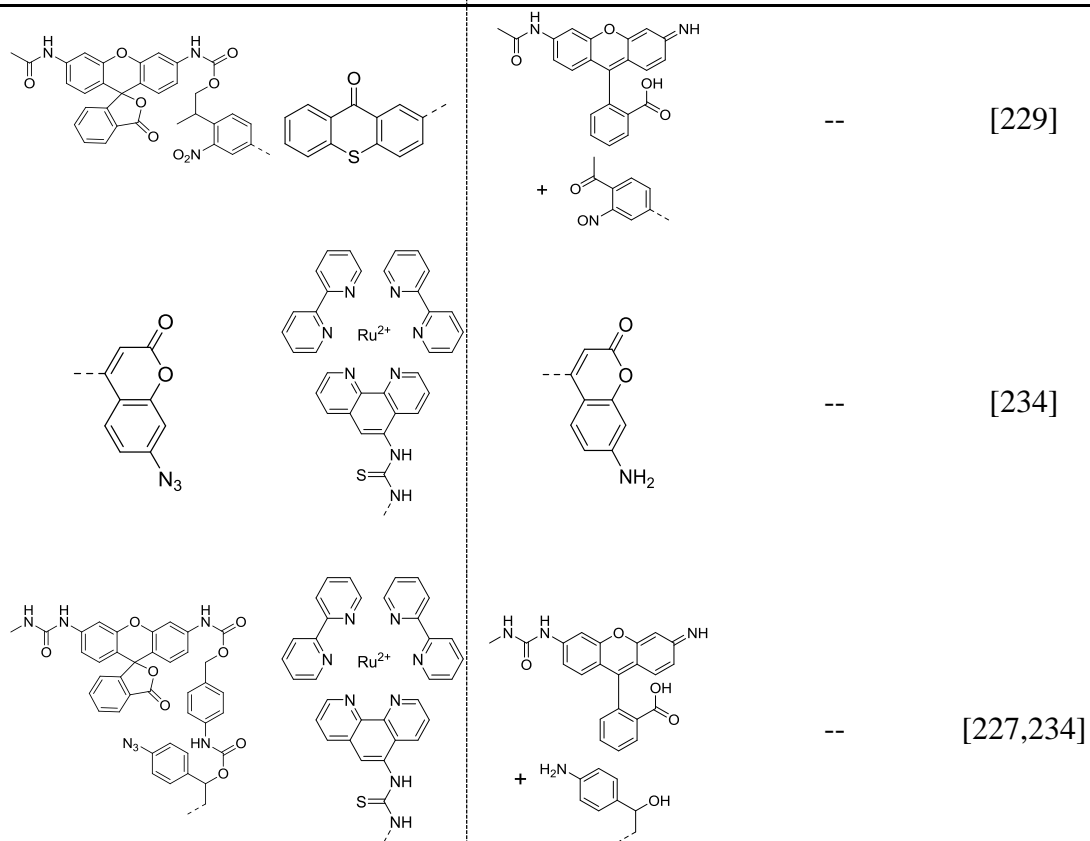
В литературе также встречаются упоминания других типов реакций, применяемых в смежных зондах. Для конденсации флуоресцентного красителя при гибридизации зондов применялись реакция Виттига[230], Pd^{II} -катализируемые кросс-сочетания[231] и некоторые специфические реакции [205,232] (табл. 1.4).

Таблица 1.4 Реакционноспособные группы и продукты реакции между смежными зондами с деблокированием/образованием флуорофора.

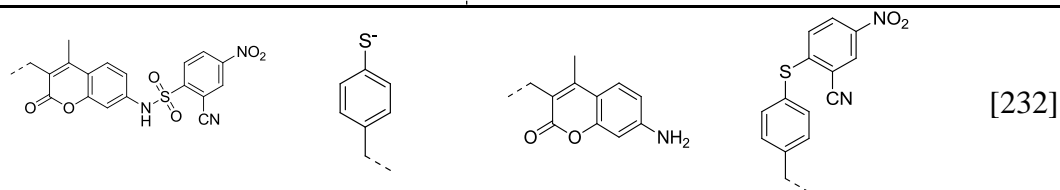
Тип реакции	Защищенный хромофор	Селективный реагент	Деблокированный краситель	Побочный продукт	Ссылки
Автокатализируемые					[212]
					[213,214]
Реакция Штаудингера					[218]
					[233]
					[219–221]

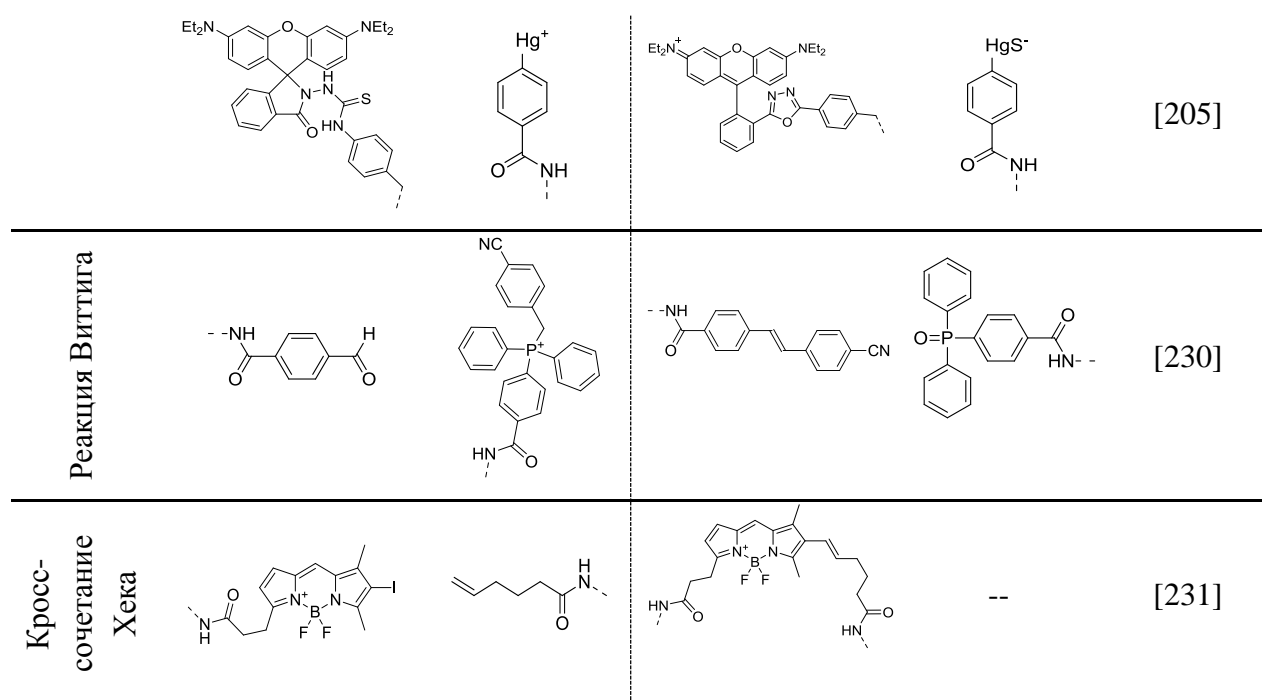


Фотоотщепление



Нуклеофильная атака





1.3.3. TaqMan зонды

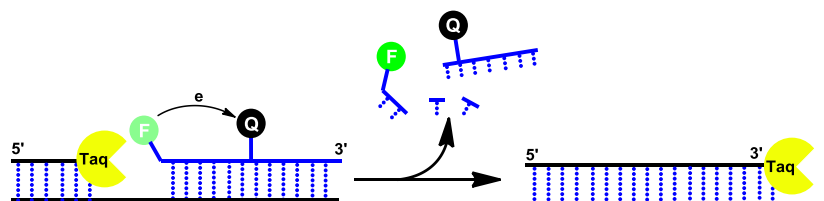


Рис. 1.27 Деградикация флуоресцентного зонда TaqMan на комплементарной матрице полимеразой с рестриктазной активностью.

TaqMan - это линейные гибридизационные зонды предложенные в 1991 году Памеллой Холланд с соавт.[235]; принцип работы зонда основан на деградации олигонуклеотидного зонда на НК-матрице за счет рестриктазной активности некоторых полимераз. Название TaqMan было предложено исходя из Taq-полимеразы (*Thermus aquaticus* ДНК-полимераза), которая обладает экзонуклеазной активностью и популярной компьютерной игры Расман. Очевидно, применение TaqMan ограничено амплификацией сигнала полимеразной цепной реакции. В работе Холланд использовали радиоактивно-меченные зонды с изотопом ^{32}P , а накопление продукта ПЦР оценивали по фрагментации зонда после каждого цикла Саузерн блоттингом с радиографией. Данный подход, однако, как и значительная часть радиоизотопных гибридизационных методов, устарел, поскольку требует достаточно трудоемкой процедуры анализа с применением гель-электрофореза и радиографии. Уже в 1993 году группой ученых были использованы TaqMan зонды меченные двумя флуорофорами[236]. Олигонуклеотидные последовательности содержали донорный флуорофор на 5'-конце FAM или TET и акцептор TAMRA в середине цепи. В

данной работе авторы заложили принцип современных флуоресцентных TaqMan зондов. Поскольку донор и акцептор располагаются на расстоянии 6 нуклеотидов, часть энергии возбуждения поглощает TAMRA, а в спектре испускания присутствуют полосы испускания обоих красителей. В ходе деградации зонда меченные нуклеотиды переходят в раствор в свободном виде, эффективность резонансного переноса при этом сводится к нулю. Таким образом, увеличение флуоресценции FAM или TET имеет линейную корреляцию с накоплением амплификата в ходе ПЦР. Использование двух красителей FAM и TET вместе с двумя последовательностями позволило провести дискриминацию мутантной ДНК от дикого типа. Анализ продуктов рестрикции зондов проводили также методом гель-электрофореза.

Применение Taq полимеразы с рестриктазной активностью совместно с флуоресцентными зондами создало мощный фундамент для метода ПЦР в режиме реального времени и создания современной приборной базы, метода, который позволяет проводить анализ не прибегая к электрофорезу и блоттингу. В 1996 г. были опубликованы две работы [237,238], в которых изложен принцип количественного ПЦР, детекция флуоресценции проходила в реальном времени. В работах приведена градуировка серий ПЦР с заведомо определенным количеством анализируемого материала и определение порогового цикла C_t . В первых методах применялись зонды меченные FAM, тушителем флуоресценции в которых выступал TAMRA.

Укорочение флуоресцентных зондов в кПЦР стало возможно за счет ДНК-связывающего лиганда MGB (minor groove binder) [239]. Более короткая последовательность зонда (порядка 12 нуклеотидов) оказалась универсальна для определения полиморфизмов одного гена. За счет MGB-лиганда удалось сохранить температуру плавления 12-нуклеотидного зонда с мишенью на том же уровне, как и для 27-звенного, при этом значительно увеличив чувствительность к последовательности мишени.

Джусси Нурми с соавт. представили в качестве метки TaqMan зондов, хелатированный ион Tb^{3+} [240]. Ион тербия обладает узкими полосами люминесценции, а квантовый выход сильно зависит от микроокружения комплекса. За счет большого времени жизни возбужденного состояния реализуется перенос энергии на нуклеотиды и тушение флуоресценции. При деградации такого зонда вероятность дипольных взаимодействий Tb^{3+} снижается, а излучательной релаксации - повышается. Зонды использовались для определения однонуклеотидных полиморфизмов в ПЦР в реальном времени. Детекция флуоресцентного сигнала с задержкой в 400 нс после каждого цикла позволила снизить фоновый сигнал и повысить чувствительность метода.

Ранее в нашей группе был проведен анализ влияния дополнительного тушителя и флуорофора в составе TaqMan-зондов на его показатели в количественном ПЦР[134]. Линейные TaqMan зонды модифицировались тушителем BHQ1 и флуорофором FAM. Кроме того, в ПЦР тестировали зонды содержащие дополнительный флуорофор FAM, тушитель BHQ1 или акцепторный флуорофор JOE. TaqMan, усиленные дополнительным красителем показали сниженный фоновый сигнал во всех случаях, однако для некоторых зондов амплификация флуоресценции оказалась ниже, что, очевидно, связано с устойчивостью к рестрикции таких зондов, особенно когда модификации располагались ближе к 3'-концу зонда.

1.3.4. Прочие зонды для кПЦР

Чувствительность и специфичность ПЦР в реальном времени в большей мере зависят от корректного подбора последовательности праймеров и зондов, а также температурного режима ПЦР. Оптимизации структуры зондов для кПЦР посвящено множество работ и обзоров. Несколько типов зондов содержат последовательность праймера в своем составе: шпилечные зонды, цикликоны и Angler[®] зонды.

1.3.4.1. Шпилечные зонды-праймеры

Зонды «скорпионы» – конъюгаты праймера и молекулярного маяка, соединенные гексаэтиленгликолевым линкером, впервые были предложены Дэвидом Уиткемом с соавт[241]. После элонгации праймерного участка и денатурации ампликата, молекулярный маяк гибридизуется с синтезированной матрицей. Комплементарность продукта ПЦР и зонда обуславливают высокую избирательность детекции. Другой вариант «скорпионов» представлен праймером, связанным гибким линкером с Инь-Янь зондом. Во время плавления дуплекса происходит денатурация и высвобождение одноцепочечного фрагмента ампликона с флуоресцентным зондом на 5'-конце. Так как ампликон ковалентно сшит с последовательностью зонда, более выгодным процессом является образование дуплекса зонд-ампликон, а не зонд-тушитель. Этот каскад сопровождается «разгоранием» флуоресценции и образованием устойчивого флуоресцирующего дуплекса. Такие зонды нашли применение в ПЦР анализе в режиме реального времени[242].

Этот же принцип заложен в основу работы зондов Amplifluor[243,244]. В данном случае зонд и праймер имеют непрерывную олигонуклеотидную последовательность. Шпилечный зонд является частично комплементарным матрице, на которой протекает ПЦР, а не вновь синтезированной цепочке, как в случае «скорпионов».

Позже Назаренко с соавт.[245] предложили шпилечные структуры LUX™, содержащие флуоресцентно-меченный цитидин в середине G-C богатого стебля и комбинированный с последовательность праймера. В стебле флуоресценция красителя заглушена, а при отжиге на матрице происходит денатурация шпильки и увеличение флуоресценции. Тушителем флуоресценции в данном случае выступают гуаниновые основания.

1.3.4.2. Цикликоны

Цикликоны[246] представляют собой праймеры, соединенные с самокомплементарной последовательностью 5'-конец к 5'-концу. Цикликоны свернуты в тор за счет образованием короткого двухцепочечного участка, таким образом, что тушитель и флуорофор сближены. При отжиге на матрице дуплекс денатурируется, а флуорофор и тушитель расходятся. Гибридизованный зонд-праймер участвует в ПЦР и включается в ДНК-последовательность синтезированного фрагмента.

1.3.4.3. Angler™

В 2002 году были сконструированы праймеры, соединенные гексаэтиленгликолевым линкером с последовательностью, комплементарной ПЦР продукту с цианиновым красителем Cy5 на 5'-конце[247,248]. После элонгации праймера самокомплементарный участок отжигается с ПЦР продуктом. После этого к реакционной смеси добавляют ДНК-связывающий краситель Sybr Gold, который, связываясь с дуплексом, приводит к резонансному переносу энергии на Cy5 и смещению полосы флуоресценции в длинноволновую область.

1.3.4.4. ResonSense™

Эти зонды имеют схожий принцип работы с Angler™[249]. Отличие заключается лишь в том, что данные зонды не содержат последовательности праймера, наоборот, 3'-конец зонда модифицирован октандиолом для предотвращения неспецифической элонгации цепи. 5'-Конец мечен акцепторным флуорофором Cy5,5, в качестве донора-флуорофора также выступает Sybr Gold.

1.3.4.5. NuBeacon™

Свойство флуорофора, встроенного в середину олигонуклеотидной цепи, взаимодействовать с ближайшими нуклеотидами использовалось при дизайне зондов NuBeacon™[250,251]. Зонд представляет олигонуклеотидную последовательность без определенной вторичной структуры, комплементарную целевой ДНК с включенной в середину флуоресцентной меткой. Особые требования применяются к флуорофору, он

должен эффективно тушиться за счет переноса энергии возбуждения на соседние нуклеозиды. Как правило, хромофор находится в определенной конформации относительно нуклеиновых оснований зонда. При гибридизации с детектируемой матрицей происходит разворачивание флуорогенной группы наружу дуплекса, сопровождающееся увеличением интенсивности флуоресценции. Окружением такого флуорофора в зонде чаще являются гуаниновые основания, это обусловлено их приоритетом в абсорбции возбуждающего излучения. Несомненным преимуществом таких структур является их простота и доступность, однако, накладываются дополнительные требования к подбору флуорофоров, связанные с невысокой эффективностью тушения флуоресценции нуклеиновыми основаниями.

1.3.5. Инь-Янь зонды

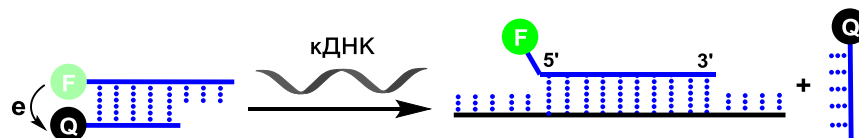


Рис. 1.28 Гибридизация Инь-Янь зонда с комплементарной мишенью.

Инь-Янь зонды представляют два комплементарных олигонуклеотида, меченных по 5'-положению одной из цепи флуорофором, а по 3'-положению другой - тушителем флуоресценции (**рис. 1.28**). При этом олигонуклеотид с 5'-флуорофором имеет последовательность длиннее. Дуплекс зонда с матрицей термодинамически более стабилен, таким образом, при накоплении продукта ПЦР происходит конкурирующее вытеснение олигонуклеотида с тушителем и увеличение флуоресцентного сигнала. За счет конкуренции матрицы с олигонуклеотидом, содержащим тушитель, Инь-Янь зонды обладают высокой специфичностью к определяемой последовательности. В первой же работе [252] такие зонды применялись для дискриминации однонуклеотидного полиморфизма в мультисканальном варианте. Были представлены зонды, содержащие четыре разных ксантеновых красителя (FAM, HEX, TAMRA, Texas Red), соответствующих четырем нуклеотидам в участке определения полиморфизма. Зонды были успешно протестированы в мультиплексном кПЦР. Позже они также успешно использовались для определения мутантных копий ДНК с высокой чувствительностью в кПЦР[253,254].

Джусси Нурми с соавт.[255] описали вариант мультиплексного анализа ПЦР с применением хелатированных ионов лантаноидов Tb^{3+} и Eu^{3+} . В дополнение к ранее описанной работе [240] они добавили к TaqMan зондам олигонуклеотид с тушителем QSY-7, комплементарный последовательности зондов. Это позволило снизить фоновую

флуоресценцию комплексов за счет комбинирования TaqMan и Инь-Янь зондов. Детекцию флуоресценции проводили в стационарном режиме, а не времяразрешенном благодаря пониженному фоновому сигналу.

1.3.6. Зонды с интеркалирующими красителями (без тушителя)

Некоторые красители известны своей способностью к увеличению квантового выхода флуоресценции при связывании с двухцепочечной последовательностью нуклеиновых кислот. Многие из них зарекомендовали себя в качестве флуоресцентного маркера в составе олигонуклеотидных зондов. При гибридизации такого зонда с матрицей фрагмент красителя фиксируется в малой бороздке или между пар оснований (интеркаляторы), что приводит к увеличению флуоресценции. Как правило, для таких зондов не характерна определенная вторичная структура, а флуорофор может быть зафиксирован в конце или середине олигонуклеотидной последовательности. Наличие тушителя также не обязательно.

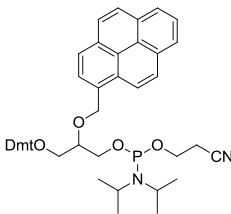
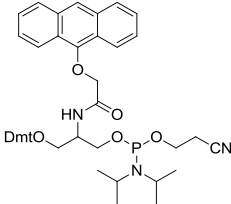
1.3.6.1. Последовательность-чувствительные зонды на основе ПАУ

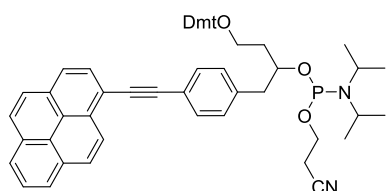
Ряд полиароматических флуорофоров, испускающих в сине-зеленой области спектра, способен взаимодействовать с олигонуклеотидной последовательностью таким образом, что квантовый выход флуоресценции сильно зависит от близлежащих нуклеотидов. Это обусловлено выраженными диполь-дипольными взаимодействиями ПАУ с нуклеиновыми основаниями, приводящими к диссипации части энергии возбуждения флуорофора. Перенос энергии происходит по механизму контактного тушения, поскольку спектры испускания не перекрываются с поглощением нуклеотидов. Этот принцип был неоднократно задействован в создании олигонуклеотидных зондов для дискриминации однонуклеотидных полиморфизмов, и отличия дезокси- и рибонуклеиновых кислот. Основопологающим для создания таких сенсоров является разработка модифицирующих реагентов с полиароматическими флуорофорами (**табл. 1.5**). Как правило, они вводятся к последовательности зонда в составе фосфамидитов на основе меченых нуклеозидов или гибких линкерах ненуклеотидной природы (**рис. 1.2**).

В ранних работах использовались полиароматические красители в качестве интеркалирующих меток. Казужиге Ямана с соавт. опубликовали ряд работ [256][257][258][259][151], в которых представлены полиароматические красители, взаимодействующие с олигонуклеотидной последовательностью. В первой работе [256] авторы упоминают усиление флуоресценции пирена и пиренового эксимера при гибридизации с комплементарной цепью. Остаток пирена встраивали в середину поли-dT

последовательности на глицериновом линкере и гибридизовали с поли-А олигонуклеотидом. Позже авторами было замечено, что некоторые флуоресцентные красители в 2'-O-положении олигонуклеотидного зонда обладают выраженной чувствительностью к РНК последовательности[257]. Так, при связывании зондов с РНК-матрицей происходит усиление квантового выхода флуоресценции. Однако по отношению к ДНК последовательностям зонды не обладают подобной чувствительностью. Изменение квантового выхода при связывании с дуплексом было продемонстрировано на антрацене, антрахиноне и пиреновых производных[260][261][262]. В 2002 году группа авторов разработала реагент для введения двух пиреновых хромофоров в последовательность зонда на линкере на основе пентаэритрита[258]. Эта структура позволяет сближаться остаткам пиренов с образованием устойчивой эксимерной флуоресценции в составе одноцепочечного олигонуклеотида. Гибридуясь с мишенью один из пиренов интеркалирует между парами нуклеиновых оснований, вследствие чего эксимерная полоса в спектре испускания полностью пропадает. Такие зонды продемонстрировали высокую избирательность в отношении полиморфизмов комплементарной мишени[259][151]. Реагент вводился в середину и 5'-конец зонда. Изменение соотношения мономерной/эксимерной флуоресценции достигало 1,5 порядков при гибридизации с ДНК-мишенью.

Таблица 1.5 Реагенты для введения интеркалирующих полиароматических флуорофоров, чувствительных к последовательности нуклеотидов в состав олигонуклеотидного зонда.

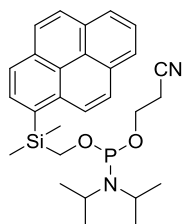
Реагент для введения интеркалятора	Положение в зонде	Тип мишени, чувствительность	Ссылка
Ненуклеозидные гибкие вставки			
	- Один или два последовательно конденсированных - Середина поли-dT последовательности	Поли-dA комплементарная цепь	[256]
	- Один - Середина зонда	ДНК-мишень, SNP	[263]



- Два
последовательно
конденсированных
- Середина зонда

ДНК-мишень,
SNP

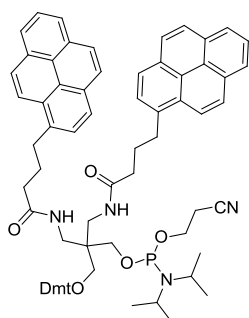
[264]



- Один
- 5'-конец

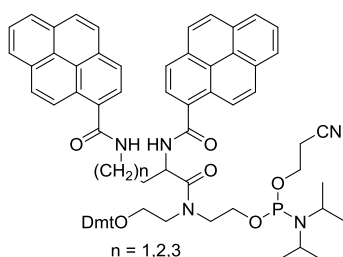
ДНК-мишень,
SNP

[265]



- Один
- 5'-конец
предпочтительно,
возможно в середину
зонда
- Линейный или
шпилечный зонд

ДНК-мишень,
SNP

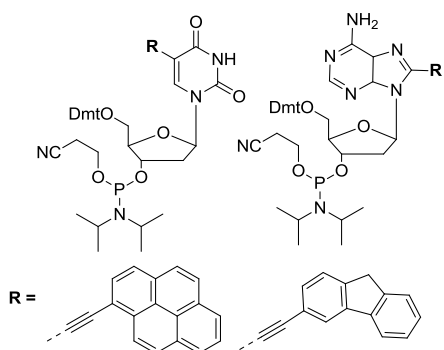
[151,258
,259]

- Один
- Середина зонда

ДНК-мишень,
инсерция
напротив
модификации

[266]

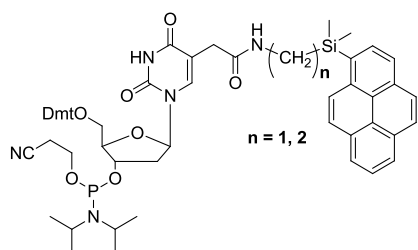
Нуклеозиды, модифицированные по нуклеиновому основанию



- Один
- 5'-конец или
середина зонда
- Линейный или
шпилечный зонд

ДНК-мишень,
SNP

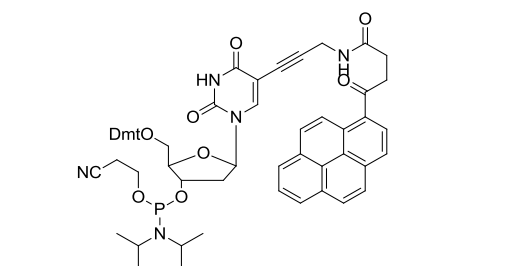
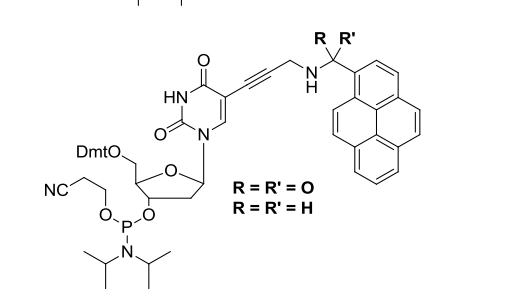
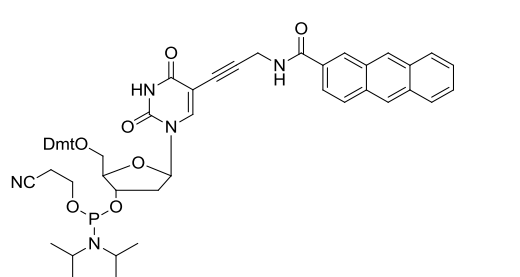
[267]



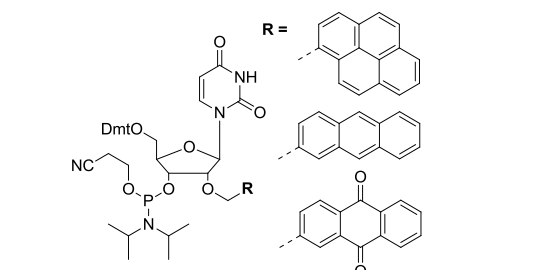
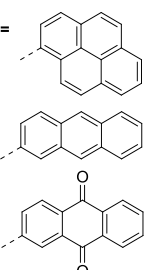
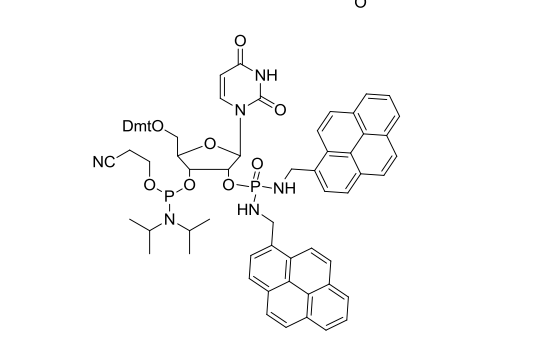
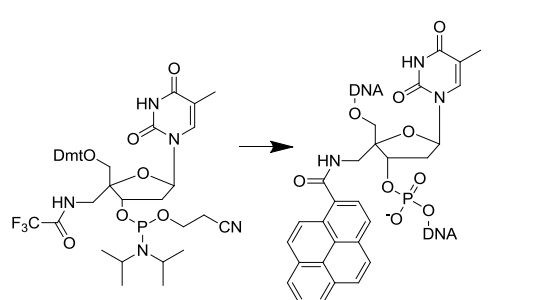
- Два
последовательно
конденсированных
- Середина зонда

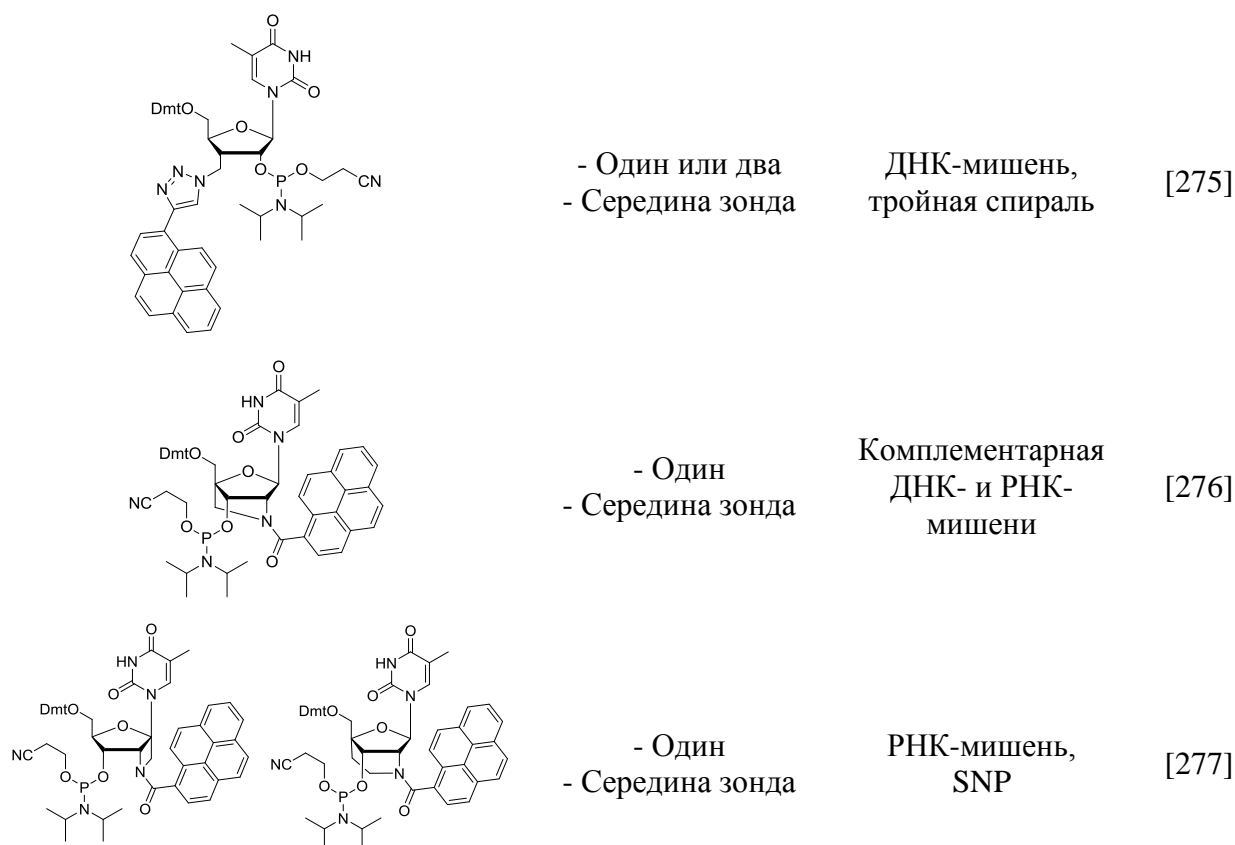
ДНК-мишень,
SNP

[268]

	<p>- Один - Середина зонда</p>	<p>ДНК-мишень, SNP</p>	<p>[269]</p>
 <p>R R' R = R' = O R = R' = H</p>	<p>- Один - Середина зонда</p>	<p>ДНК-мишень, SNP</p>	<p>[270,271]</p>
	<p>- Один - Середина зонда</p>	<p>ДНК-мишень, SNP</p>	<p>[272]</p>

Нуклеозиды модифицированные по углеводной части

 <p>R =</p> 	<p>- Один или два последовательно конденсированных для R = пирен - Середина зонда</p>	<p>РНК-мишень, SNP</p>	<p>[257,260 -262]</p>
	<p>- Один - Середина зонда</p>	<p>Комплементарная ДНК- и РНК- мишени</p>	<p>[273]</p>
	<p>- Один - Середина зонда</p>	<p>ДНК-мишень, SNP</p>	<p>[274]</p>



1.3.6.2. Зонды с тиазоловым оранжевым

Использование линейных олигонуклеотидных зондов со специфическими ДНК-связывающими флуоресцентными красителями позволяет исключить тушителю из состава флуоресцентного зонда. Тиазоловый оранжевый (ТО) – гемицианиновый краситель, который при взаимодействии с двухцепочечной ДНК, многократно увеличивает квантовый выход флуоресценции. При связывании с малой бороздкой или интеркалируя между пар нуклеотидов два гетероциклических фрагмента красителя фиксируются относительно метиновой перемычки в плоской конформации, при этом появляется способность к излучательному переходу энергии при возбуждении красителя [278]. Это свойство было неоднократно продемонстрировано на самом ТО и его производных и гетероаналогах, которые имеют широкий спектр аналитических приложений для детекции ДНК: ТО, YO, ТО-PRO-1, YO-PRO-1, TOTO, YOYO, SYBR Green I, Pico Green и прочие [279–282].

Олигонуклеотидный зонд, ковалентно-меченный тиазоловым оранжевым, обладает практически нулевой фоновой флуоресценцией в зеленой области спектра. При гибридизации с комплементарной мишенью происходит связывание ТО с образовавшимся дуплексом и увеличение квантового выхода красителя вплоть до 0,8. Решающим в дизайне таких зондов является тип и длина линкера, соединяющего ТО и олигонуклеотид.

Сайтом модификации ТО служит атом азота хинолинового бицикла или *N*-3 бензотиазола. Введение интеркалирующих красителей в ДНК и РНА зонды возможно как в середину последовательности на треонинольных мономерах, на модифицированных по 5-положению тимидине или в терминальное положение за счет на длинном линкере. В качестве последовательности зонда часто используют полипептидную цепь, заменяющую сахарофосфатный остов. Такой подход обеспечивает минимальное взаимодействие самого зонда с тиазоловым оранжевым, при этом не теряя способности к гибридизации с целевой молекулой. Серия цианиновых интеркалирующих аналогов ТО, покрывающая весь спектральный диапазон, была разработана и успешно применена в составе зондов[283]. Зонды с ТО оказались эффективны для отслеживания амплификации в реальном времени[284,285], однонуклеотидных полиморфизмов[286–288], также они могут быть использованы для определения специфических последовательностей РНК в живой или фиксированной клетке[289,290].

ГЛАВА 2. Обсуждение результатов

Мономеры на основе D-(-)-пантолактона и азидопроизводные для мечения олигонуклеотидов

2.1 Эксимерные молекулярные маяки

Свойство пирена образовывать возбужденный димер (эксимер) было неоднократно использовано в гибридизационных олигонуклеотидных зондах[64,66,67,291]. При планарном сближении двух пиреновых хромофоров на достаточно близкое расстояние поглощенный квант света в виде энергии перераспределяется между орбиталями двух молекул, результатом чего является появление новой длинноволновой полосы в спектре испускания. По возникновению эксимерной флуоресценции можно судить, например, о сближении двух пиреновых хромофоров в составе НК-зондов на комплементарной им матрице[292]. Однако некоторые полезные свойства пиренового эксимера обособляют его также как отдельный флуоресцентный маркер от прочих органических флуорофоров: значения Стоксова сдвига более 100 нм, время жизни возбужденного состояния достигает 0,1 мкс[62], высокая инертность в отношении биомолекул и биологических сред. С другой стороны, пиреновый эксимер является комплексным флуорофором и на яркость его флуоресценции оказывает влияние не только квантовый выход флуоресценции и коэффициент молярного поглощения, но и соотношение эксимерной и мономерной (Е/М) флуоресценции. Пирен и его эксимер склонны к диполь-дипольным взаимодействиям со своим окружением, что может приводить к значительному тушению эксимерной флуоресценции. Особенно стоит отметить чувствительность флуоресценции пирена к олигонуклеотидным последовательностям и его способность интеркалировать между пар оснований, что было неоднократно продемонстрировано на олигонуклеотидных конъюгатах пирена, в частности для определения однонуклеотидных полиморфизмов (подробнее смотри раздел 1.3.6.1. *Последовательность-чувствительные зонды на основе ПАУ*). Учитывая вышеизложенное стоит отметить, что пиреновый эксимер является уникальным флуорофором, однако непостоянство его фотофизических свойств осложняет его использование в качестве маркера. Дизайн зондов и самих пиреновых реагентов, очевидно, требует детальной оптимизации для улучшения флуоресцентных характеристик эксимера.

Помимо последовательности олигонуклеотидных зондов, критичен также и способ введения остатков пирена в зонд. Ранее для введения двух пиренов в соседние положения, как правило, синтезировались нуклеозидные реагенты уже содержащие два пиреновых остатка[120,151]. В своих работах группа Хэнера использует донорно-акцепторный

комплекс 1,7-бисэтинилпирена и перилендиимида, введенный в середину стебля молекулярных маяков[153,293,294]. При гибридизации с мишенью удавалось добиться практически полного исчезновения флуоресценции пирена на фоне эксимерного максимума. Тем не менее, такой подход в значительной степени ограничен, поскольку эксимер и тушитель вводятся в середину, а не в 5'- и 3'-концы последовательности зонда. Кроме того, введение дополнительных остатков пирена в состав эксимера значительно повышает Е/М соотношение[67,120]. Такой способ оптимизации также не лишен недостатков, поскольку излишние пиреновые модификации в составе зонда могут отрицательно влиять на его растворимость и аффинность. Свойство пиренов образовывать комплекс включения с γ -циклодекстрином было открыто Такехико Йорозу с соавт[295]. При добавлении γ -циклодекстрина к водному раствору пирена в спектре флуоресценции появлялась полоса испускания эксимера. В современных работах γ -циклодекстрины использовали для стабилизации эксимера в составе олигонуклеотидных зондов и повышения Е/М соотношения[130]. Во всех случаях γ -циклодекстрины добавляли после связывания зондов с аналитом, использование γ -циклодекстрина совместно с пиреновыми зондами в реальном времени, очевидно, может привести к завышенному фоновому сигналу.

2.1.1 Синтез мономеров на основе D-(-)-пантолактона для мечения молекулярных маяков

Оптимизировать эксимерный маркер также можно, последовательно вводя пиреновые остатки в олигонуклеотидный зонд при твердофазном синтезе. Ряд ненуклеозидных фосфамидитов, содержащих диметокситритильную группу, для последовательной конденсации был разработан ранее (рис. 2.1).

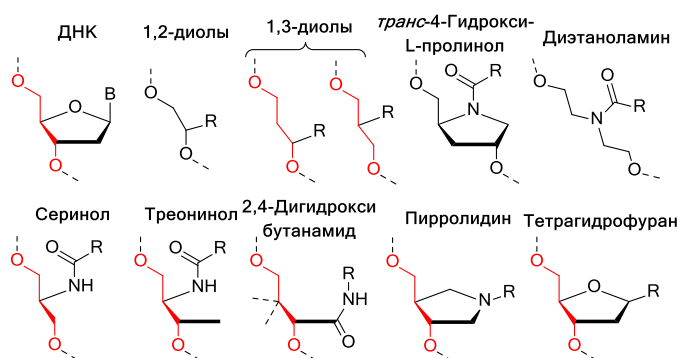


Рис. 2.1 Ненуклеозидные аналоги остатка рибозы в олигонуклеотидах. Красным отмечена последовательность трех углеродных атомов между 5'- и 3'-гидроксилами.

К ним относятся алкилированные глицерины, ацилированные 1-аминопропан-2,3-диолы, прочие производные 1,3-диолов, восстановленные природные гидроксиаминокислоты: серинол, треонинол и 4-гидроксипролинол. Использование амидитов на основе 1,2-диолов в олигонуклеотидном синтезе приводит к их частичному удалению при деблокировании

олигонуклеотидов с твердой подложки за счет образования циклофосфатов. Введение прохиральных синтонов и рацематных смесей в олигонуклеотиды приводят к образованию диастереомерных олигонуклеотидных конъюгатов, что осложняет их очистку и характеризацию. Помимо этого, пространственное расположение некоторых нуклеозидных каркасов может затруднить сближение пиренов и предотвратить образование эксимера[296].

Нами был разработан двухстадийный синтез аминокдиола **2** исходя из коммерчески-доступного D-пантолактона (**рис. 2.2**). Раскрытие лактонового цикла аммиаком протекает в мягких условиях с количественным выходом, полученный амид затем восстанавливали комплексом BMS в абсолютном ТГФ. Выделение целевого соединения **2** из реакционной смеси классическими способами при разложении органоборанового комплекса невозможно из-за его высокой гидрофильности. Поэтому по окончании реакции реакционную смесь разлагали водой с набухшей ионообменной смолой Dowex 50WX8 в H^+ -форме. Катионит с сорбированным амином отделяли фильтрованием, промывали для отделения побочных продуктов, амин **2** элюировали смесью метанола с 5% триэтиламина. Сконцентрировав элюат, получили продукт в виде кристаллической массы с выходом 76%. Разработанная методика позволяет быстро нарабатывать соединение **2** в две стадии в мультиграммовой шкале без хроматографической очистки. Очевидно, что метод может быть применен и для восстановления прочих водорастворимых амидов – как первичных, так и вторичных и третичных. Хиральный аминокдиол **2** подходит для создания на его основе модифицированных фосфамидитов для введения в олигонуклеотидную последовательность. Модификации удобно вводить в соединение **2** по аминогруппе ацилированием, а неэквивалентные гидроксильные группы позволяют избирательно защищать первичную диметокситрилом, а затем по вторичной вводить фосфамидитную группу.

Ранее было опубликовано, что флуоресцентные свойства сильно зависят также от группы атомов, соединенных непосредственно с самим пиреном[297]. Нами были отобраны пирен-1-уксусная и пирен-1-карбоновая кислоты для создания на их основе эксимерных флуорофоров. Для этого аминокдиол **2** ацилировали пентафторфениловыми эфирами кислот, полученные амиды были выделены с количественными выходами. После упаривания сухой остаток перетирали с водой и отфильтровывали, отделяя от пентафторфенола и аминов. Выделенные предшественники **3а,б,в** были защищены Dmt-группой по первичному гидроксилу. Поскольку вторичный гидроксил экранирован двумя метильными группами, для фосфитилирования требуются более реакционноспособный реагент, чем обычно для нуклеозидов – *N,N*-диизопропиламино-2-цианэтоксихлорфосфин

и основание DIPEA. Реакция протекает полностью менее чем за час в мягких условиях, однако образуется некоторое количество побочных продуктов, для отделения от которых приходилось прибегать к хроматографической очистке.

В качестве тушителя флуоресценции в голубой/зеленой областях был выбран азокраситель Dabcyl, который также вводили к синтону **2** через соответствующий хлорангидрид. В данном случае ацилирование протекает менее избирательно, продукт очищали хроматографически. Далее диметокситритилирование и фосфитилирование проводили подобно пиреновым производным с отличными выходами. Также исходя из Dmt-защищенного производного Dabcyl **4в** был синтезирован модифицированный твердофазный носитель **7в** на основе пористого стекла с привитыми аминогруппами. С этой целью по вторичному гидроксилу вводился остаток янтарной кислоты. Полученный полуэфир **6в** после хроматографической очистки конденсировали с аминогруппами на поверхности стекла при помощи реагента PyBOP. Следует отметить, что введение сукцината также осложняется наличием двух метильных групп в α -положении к гидроксилу, поэтому реакцию проводили в абсолютном пиридине с катализом DMAP.

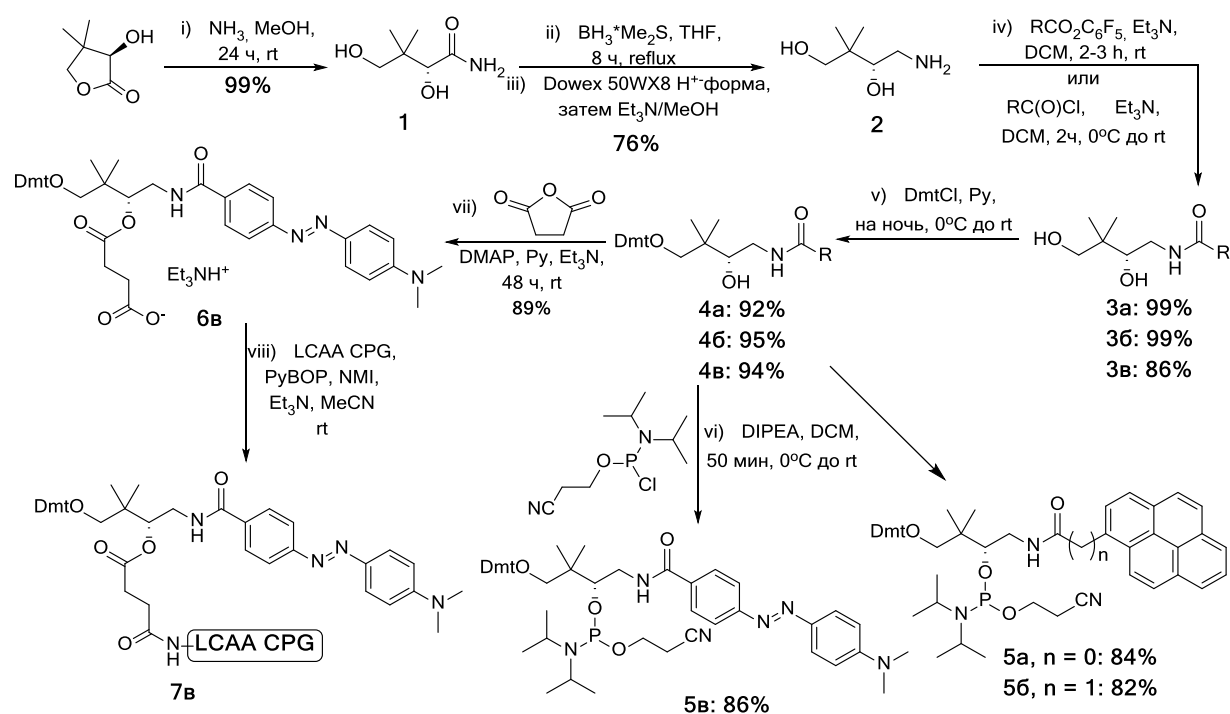


Рис. 2.2 Схема синтеза фосфамидитов и модифицированного пористого стекла для твердофазного синтеза эксимерных молекулярных маяков.

Поскольку были получены принципиально новые мономеры для олигонуклеотидного синтеза, стоило провести отнесение протонных и углеродных сигналов для этих структур. К сожалению, из-за наличия диастереомерии фосфамидитов **5а,б,в** и, видимо, затрудненного вращения объемных заместителей, отнесение сигналов

для них крайне затруднительно, а спектры ^{13}C и вовсе малоинформативны. Поэтому отнесение сигналов в ^1H и ^{13}C спектрах было сделано для их предшественников – соединений **4а,б,в** на основании ^{13}C -DEPT спектров и двухмерных корреляций ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HMBC (Приложения 5–10).

2.1.2. Синтез молекулярных маяков, меченных пиреновыми флуорофорами и тушителем Dabcyl

Полученные амидофосфиты и модифицированный носитель были использованы в твердофазном синтезе шпилечных зондов – молекулярных маяков. Были выбраны две олигонуклеотидные последовательности зондов, оптимизированные ранее на паре красителей FAM/BHQ1[298].

Таблица 2.1 Последовательности синтезированных эксимерных молекулярных маяков (**Seq1** и **Seq2**) и комплементарной ДНК матрицы (**Seq3**). Тушителю и флуорофору обозначены 5'-F и 3'-Q, соответственно. Жирным шрифтом обозначен самокомплементарный участок, подчеркнут участок комплементарный матрице.

Seq1:												
5'-F- GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC -Q-3'												
Зонд	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	MB6	MB7	MB8	MB9	MB10	MB11	MB12
5'-F	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2
3'-Q	Dabcyl						2×Dabcyl					
Seq2:												
5'-F- CCGGGGCTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGG -Q-3'												
Зонд	MB13	MB14	MB15	MB16	MB17	MB18	MB19	MB20	MB21	MB22	MB23	MB24
5'-F	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2
3'-Q	Dabcyl						2×Dabcyl					
Seq3:												
5'-TTGAG GCGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGGGAG -3'												

Синтез начинался с Dabcyl-модифицированного носителя **7в**, для введения тушителя в 3'-положение зонда (рис. 2.3). Поскольку ранее в нашей группе было показано, что дополнительный тушитель флуоресценции в ДНК-зондах способствует значительному снижению фоновой флуоресценции, мы синтезировали также зонды с двойным тушителем 3'-Dabcyl. Для этого последовательно конденсировали амидит с Dabcyl **5в** на модифицированный носитель **7в** с последующей элонгацией олигонуклеотидной цепи. В 5'-положение зонда вводили одиночные и конденсированные пиреновые модификации. Последовательной конденсацией амидофосфитов **5а** и **5б** были получены зонды с четырьмя эксимерными комбинациями: P1P1, P1P2, P2P1 и P2P2, а также одиночными пиренами: P1 и P2 (табл. 2.1). Все олигонуклеотидные зонды были охарактеризованы масс-спектрами и ВЭЖХ на обращенной C18-фазе (Приложение 2).

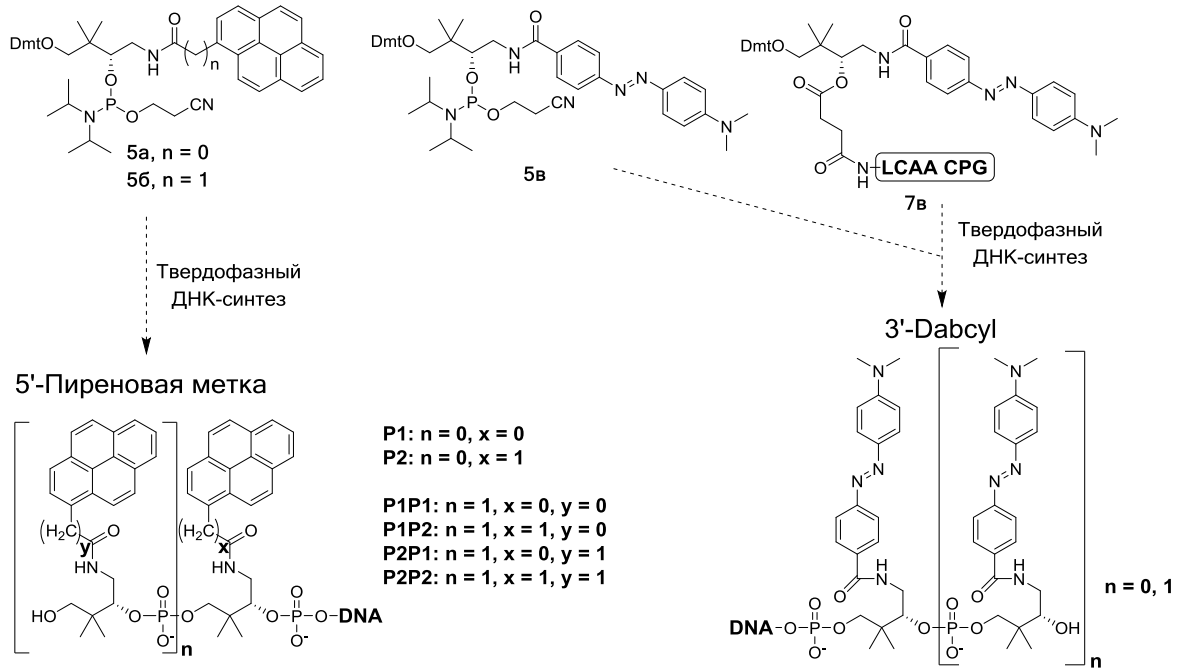


Рис. 2.3 Схема синтеза пиреновых меток и тушителей в ходе твердофазного фосфамидитного синтеза олигонуклеотидных зондов.

Таблица 2.2 Температуры флуоресцентного плавления шпилек молекулярных маяков, меченных парой пиреновых хромофоров и их дуплекса с ДНК матрицей Seq3.

Зонд	5'-F	3'-Q	Температура плавления, °C	
			Зонд в шпильке	Дуплекс с Seq3
MB2	P1P1	Dabcyl	73	68
MB3	P2P1	Dabcyl	74	66
MB5	P1P2	Dabcyl	75	64
MB6	P2P2	Dabcyl	77	65
MB8	P1P1	2×Dabcyl	79	65
MB9	P2P1	2×Dabcyl	77	65
MB11	P1P2	2×Dabcyl	78	67
MB12	P2P2	2×Dabcyl	80	68
MB14	P1P1	Dabcyl	68	69
MB15	P2P1	Dabcyl	65	62
MB17	P1P2	Dabcyl	72	69
MB18	P2P2	Dabcyl	71	68
MB20	P1P1	2×Dabcyl	69	68
MB21	P2P1	2×Dabcyl	68	62
MB23	P1P2	2×Dabcyl	74	68
MB24	P2P2	2×Dabcyl	74	66

Для оценки стабильности шпильки молекулярных маяков и гибрида с ДНК-матрицей **Seq3** определяли температуры плавления дуплексов. Данные получили из серии экспериментов флуоресцентного плавления, проведенного в кПЦР-амплификаторе. Мы сравнили полученные данные с температурами плавления зондов, синтезированных ранее с теми же последовательностями и флуорофорами: 5'-FAM и 5'-JOE и тушителем 3'-BHQ-1 вместо пиреновой пары и Dabcyl соответственно [127,299]. Определенно просматривается тенденция к увеличению температуры плавления (определена по перегибу кривой разгорания флуоресценции при нагревании) шпилек зондов на 5–7°C за счет стабилизации взаимодействия модификаций друг с другом или последовательностью зонда, особенно в случае двойного тушителя (**табл. 2.2**).

2.1.3. Изучение фотофизических свойств полученных зондов

Далее для определения фотофизических характеристик пиреновые зонды гибридизовали с комплементарной матрицей **Seq3** с 10% избытком в гибридизационном буфере. Для зондов и их дуплексов определяли Е/М соотношение и отношение полезного сигнала к фону. Для пирена с сопряженной амидной группой спектр поглощения и флуоресценции оказался сглаженным, в то время как для пиренацетамида наблюдается колебательно-вращательная структура электронных спектров (**рис. 2.4**). При этом максимумы поглощения и испускания совпадают. Для зондов с конденсированными пиреновыми остатками в спектрах испускания нами была обнаружена любопытная закономерность: при различных комбинациях пиреновых мономеров **5a** и **5b** в составе эксимерной метки мы наблюдали смещение эксимерного максимума в спектрах испускания с 475 нм до 510 нм. Кроме того, от состава эксимера сильно зависит и его стабильность, Е/М соотношение варьируется в диапазоне от 0,5 до 8,6. При этом значения длин волн испускания и соотношения Е/М определяются порядком и составом конденсированных пиреновых производных **5a** и **5b** и практически не зависят от олигонуклеотидной последовательности (**табл. 2.3**). По смещению эксимерной флуоресценции в длинноволновую область можно расположить комбинации пиренов следующим образом: P2P2 – 475 нм, P1P1 – 505 нм, P1P2 и P2P1 – 510 нм. Эксимер, образованный остатками мономеров P1P1 оказался самым стабильным и ярким исходя из спектров флуоресценции (**рис. 2.5**).

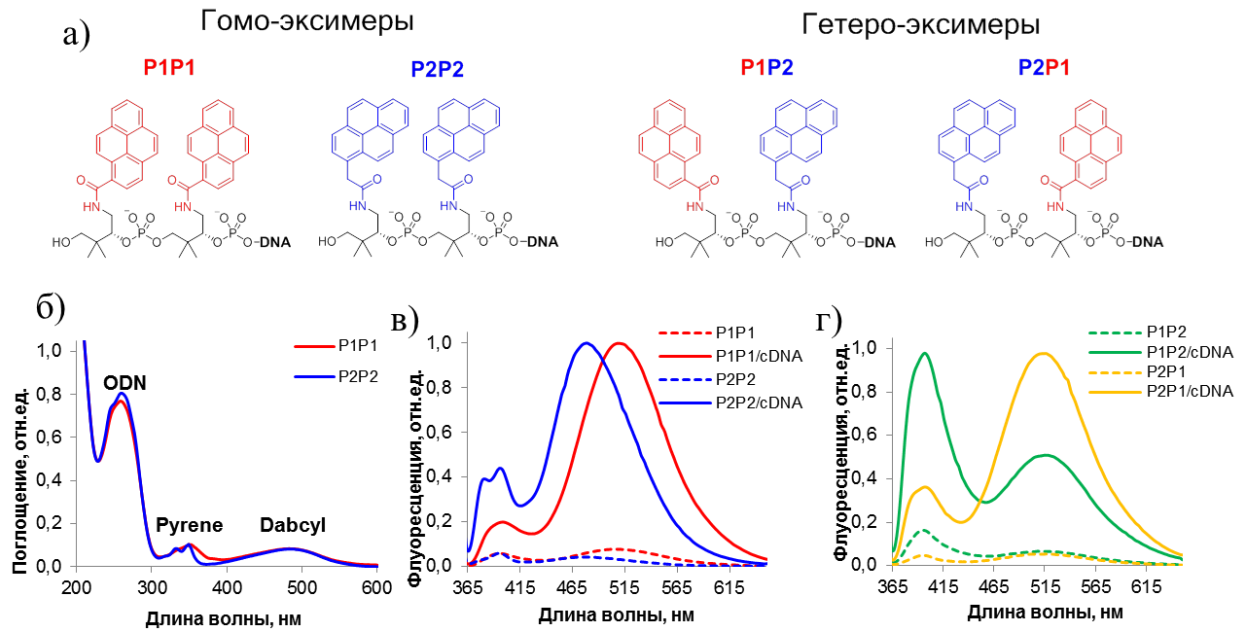


Рис. 2.4 а) Структура четырех пиреновых флуорофоров с эксимерной флуоресценцией; б) типичные спектры поглощения двух зондов MB20 и MB24 меченных 5'-P1P1 и 5'-P2P2 пиреновыми парами и 3'-Dabcyl; в) нормированные спектры испускания шпилечных зондов (пунктирные линии) и их дуплексов с матрицей **Seq3** (сплошная линия): MB20 (**P1P1**) – красная линия, MB24 (**P2P2**) – голубая линия; г) MB21 (**P2P1**) – желтая линия, MB23 (**P1P2**) – зеленая линия.

Таблица 2.3 Флуоресцентные параметры эксимерной метки в составе молекулярных маяков и данные молекулярного моделирования.

Зонд	5'- Пиреновая пара	Эксимер λ_{\max} , нм	SBR ^a		E/M ^c	Среднее расстояние, Å ^б	Среднее перекрытие ^в	
			Моно	Exc				
Seq1	MB2	P1P1	505	3,2	4,6	5,9	7,1±2,3	9,6
	MB3	P2P1	510	3,1	2,1	3,5	9,5±3,6	5,7
	MB5	P1P2	510	5,6	4,6	1,0	10,9±2,7	5,7
	MB6	P2P2	475	19,5	4,4	1,5	10,9±2,9	5,0
Seq2	MB14	P1P1	505	2,2	23,1	5,4	6,2±2,2	10,9
	MB15	P2P1	510	5,3	16,1	2,6	9,3±3,1	9,2
	MB17	P1P2	510	3,8	3,4	0,5	9,1±3,1	7,7
	MB18	P2P2	475	2,8	22,1	2,5	10,2±3,6	3,1

а) Отношение сигнал фон рассчитывали как отношение $I_{\text{ПМВ}i}/I_{\text{ОМВ}i}$, где $I_{\text{ОМВ}i}$ – фоновая флуоресценция самокомплементарного шпилечного зонда MB_i, $I_{\text{ПМВ}i}$ – флуоресценция дуплекса зонда с матрицей **Seq3**; б) отношение $I_{\text{ПМВ(Exc)}}/I_{\text{ПМВ(Pyr)}}$ гибридов зондов с матрицей **Seq3**; в) рассчитанные из молекулярной динамики.

Стоит отметить, однако, что введение дополнительного тушителя в структуру зонда не привело к изменениям в интенсивности флуоресценции пиреновых зондов как до, так и после гибридизации с комплементарной матрицей. Эффект усиленного тушения, обнаруженный для зондов меченных FAM и JOE[126,127,299], очевидно не

распространяется на пиреновый эксимер. Значительный вклад в фоновую флуоресценцию зонда оказала терминальная пара нуклеотидов, расположенная на конце стебля. Для зондов последовательности **Seq1** фоновый сигнал шпилечного зонда оказался завышен по сравнению с зондами **Seq2**.

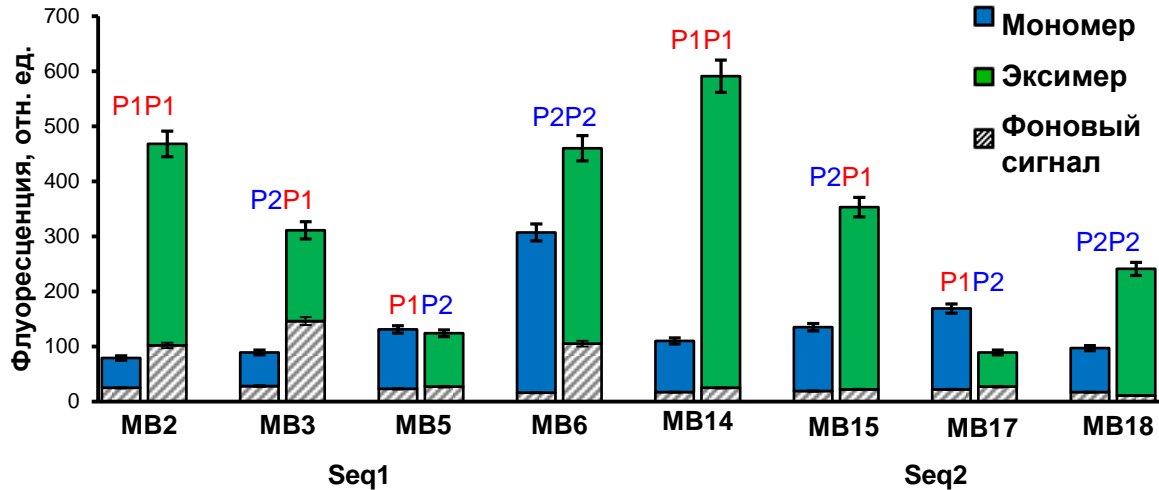


Рис. 2.5 Интенсивность мономерной и эксимерной флуоресценции зондов. Заштрихованные столбцы (I_{0MBi} , dashed bars) – фоновая флуоресценция в шпилечной форме, цветные столбцы ($I_{PMBi} - I_{0MBi}$) – увеличение флуоресценции при гибридизации с матрицей Seq3, голубые столбцы для мономерной флуоресценции, зеленые – для эксимерной.

2.1.4. Молекулярное моделирование стабильности эксимерных флуорофоров

Для объяснения различной интенсивности эксимерной флуоресценции и соотношения эксимерной к мономерной флуоресценции в ряду гомологичных пиреновых хромофоров мы решили прибегнуть к методам молекулярной динамики. Очевидно, при прочих равных условиях увеличение амплитуды полосы длинноволнового максимума флуоресценции говорит о большей стабильности пиренового эксимера. То есть, с большей вероятностью два пиреновых фрагмента находятся в стэкинге, а также с большей контактной площадью взаимодействия. Для оценки параметров стабильности эксимера в пиреновых флуорофорах совместно с Андреем Викторовичем Головиным (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова) были построены 5'-концевые фрагменты зондов: 6 нуклеотидных остатков с терминальными пиреновыми парами. Каждый из четырех эксимерных маркеров был смоделирован на двух последовательностях, соединенный с 5'-G или 5'-C, что соответствует двум последовательностям зондов **Seq1** и **Seq2** (табл. 2.4).

Таблица 2.4 Моделируемые 5'-фрагменты стебля молекулярных маяков, меченные пиреновой парой.

Зонд	5'-Фрагмент	Зонд	5'-Фрагмент
MB2	P1P1-GCGGGG	MB14	P1P1-CCGGGG
MB3	P2P1-GCGGGG	MB15	P2P1-CCGGGG
MB5	P1P2-GCGGGG	MB17	P1P2-CCGGGG
MB6	P2P2-GCGGGG	MB18	P2P2-CCGGGG

Далее проводили оптимизацию геометрии молекул рассчитывая заряд молекул, исходя из электростатического потенциала как описано в [300], и осуществляли моделирование методом молекулярной динамики. Учитывая, что пиреновые хромофоры в зондах соединены гибким линкером (**рис. 2.4а**), процесс образования эксимерной флуоресценции при сближении пиренов - это динамический процесс. Соответственно, стабильность эксимера в нашей системе можно описать как вероятность сближения и перекрывания пиренов с образованием НСМО эксимера. Руководствуясь этими соображениями, были выбраны два статистических параметра, влияющие на эксимерную флуоресценцию: вероятность столкновения пиренов и перекрывание электронных облаков пиренов. Для каждого фрагмента зонда мы получили набор из десяти траекторий во временном интервале 100 нс.

Мы построили временную зависимость количества контактов между атомами углерода, находящимися на расстоянии не более 4,0 Å в двух пиренах для всех десяти траекторий, из чего рассчитали вероятностное распределение площади перекрывания пиреновых фрагментов (**приложение 4, рис 2.6**). После чего рассчитали среднее количество взаимодействий между атомами углерода в пиреновых остатках для каждого 5'-фрагмента (**табл. 2.3**). Эта искусственная характеристика соответствует перекрыванию полиароматических фрагментов, находящихся в стэкинге, и коррелирует с данными, полученными из спектров флуоресценции соответствующих зондов.

Кроме того, важно определить саму вероятность нахождения двух пиренов в стэке. С этой целью мы также построили график зависимости расстояния между центрами пиренов от времени. Из этих данных мы получили средние расстояния между центрами пиренов для каждой траектории и усреднили их (**табл. 2.3**). Из **рис. 2.6** видно, что два фрагмента с эксимером P1P1 обладают большим числом контактов пиренов чем остальные шесть (розовая и голубая кривые), кроме того, среднее расстояние в динамических траекториях между остатками пирена в паре P1P1 оказалось наименьшим. Эти данные удачно коррелируют с анализом спектров флуоресценции: соотношение Е/М максимально для зондов MB2 и MB14, меченных парой P1P1.

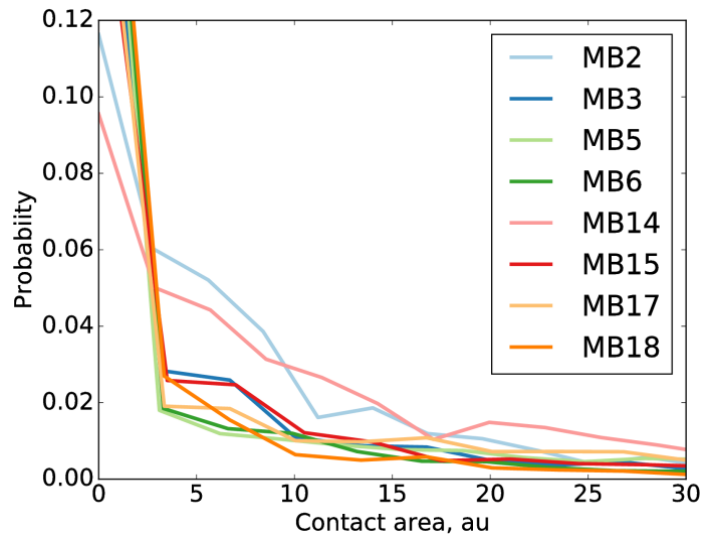


Рис. 2.6 Вероятностное распределение площади перекрытия пиреновых остатков в составе зондов. Площадь взаимодействия рассчитана в количестве контактных атомов в противостоящих пиреновых остатках. Перекрытие пиренов учитывалось, только если расстояние между центрами соседних пиренов меньше или равно 4.0 \AA .

2.1.5. Пиреновый эксимер в качестве FRET-донора в олигонуклеотидных зондах

Классическим цитогенетическим методом анализа последовательностей внутри фиксированных клеток или тканей является гибридизация *in situ* (ISH). Если олигонуклеотидный зонд мечен флуоресцентным маркером, речь идет о флуоресцентной гибридизации (FISH). Благодаря современным методам интернализации олигонуклеотидных зондов стало возможно детектировать РНК последовательности и отслеживать транскрипцию в реальном времени. Если речь идет о визуализации низкокопийных или коротких последовательностей, а также пространственно затрудненных НК, необходимо прибегать к различным методам усиления флуоресцентного сигнала и/или подавления фоновой флуоресценции (см. обзор литературы).

Для повышения избирательности в классическом анализе FISH применяют длинные олигонуклеотидные последовательности и ПЦР-продукты, меченные флуорофорами. Однако зачастую даже подбор высокоспецифичной последовательности не позволяет добиться контрастной картины, особенно для коротких РНК мишеней. Для визуализации в живых клетках часто прибегают к смежным зондам и молекулярным маякам для снижения фоновой флуоресценции и получения четких изображений. Как упоминалось в литературном обзоре, существует множество подходов к дизайну зондов для клеточной визуализации. Неспецифические взаимодействия могут быть обусловлены ДНК-связывающими белками, неудачным дизайном последовательности, деградацией зонда ферментами, гидрофобностью маркеров и зонда в целом. С другой стороны использование FRET пары при удачном дизайне маркеров и самого зонда могут

значительно снизить уровень шума. Обычно с этой целью прибегают к донорно-акцепторным парам на основе классических флуоресцентных маркеров: Cy3, Cy5, FAM, TAMRA, Alexa 488, Bodipy 493/503.

Пиреновый эксимер является потенциально удачным донором флуоресценции вследствие большого времени жизни возбужденного состояния. Широкая полоса эксимера перекрывается с поглощением множества красителей в желто-зеленой области (450–650 нм). В качестве нетривиальной донорно-акцепторной пары флуорофоров нами были подобраны пиреновый эксимер/Cy3. Помимо времени жизни флуоресценции эксимера, на эффективность FRET положительно отражается отличное перекрывание спектра испускания эксимера и поглощения Cy3 и высокий коэффициент молярного поглощения Cy3 ($\sim 150000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$)[301]. Кроме того, флуоресценция Cy3 не возбуждается при облучении мягким ультрафиолетом на максимуме поглощения пирена. Ранее цианиновый краситель Cy3 зарекомендовал себя как наиболее яркий флуорофор в иммуногистохимии[75] и для анализа FISH [302–304]. Применение эксимерного молекулярного маяка в тандеме со смежным зондом, меченным Cy3 на 3'-конце приведет к увеличению Стоксова сдвига до 220 нм, возбуждая Cy3 на 350 нм. Энергия испускания пирена и эксимера в широком голубом и зеленом диапазоне будет сконцентрирована в узкой полосе испускания Cy3 с максимумом флуоресценции при 570 нм (рис. 2.7).

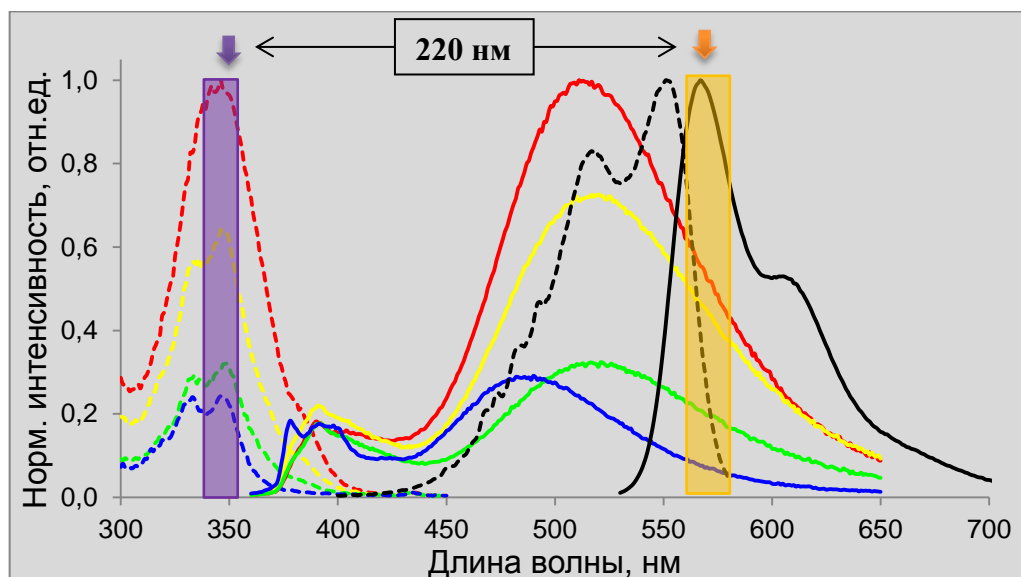


Рис. 2.7[†] Спектры возбуждения пиреновых пар при регистрации флуоресценции на максимуме эксимерной флуоресценции (пунктирные линии) и спектры флуоресценции (сплошные линии): MB14 (P1P1) – красные, MB15 (P2P1) – желтые, MB17 (P1P2) – зеленые, MB18 (P2P2) – синие. Спектры возбуждения (пунктирная черная линия) и флуоресценции (сплошная черная линия) сульфо-Cy3. Фиолетовым и оранжевым цветами условно обозначены каналы возбуждения и регистрации флуоресценции на 350 и 570 нм соответственно.

[†] Спектры флуоресценции и возбуждения зарегистрированы на спектрофотометре Fluorolog-3 (Horiba JY).

На **рис. 2.7** представлены спектры испускания четырех молекулярных маяков MB14,15,17,18, гибридованных на комплементарной матрице и спектры возбуждения эксимерной флуоресценции. Поскольку ранее мы имели дело с эксимерами, образованными четырьмя комбинациями пиреновых пар (P1P1, P2P1, P1P2, P2P2), которые обладают различной интенсивностью флуоресценции и длинноволновым максимумом испускания, мы задались целью изучить поведение каждой из четырех меток как Фёрстеровского акцептора.

2.1.6. Изучение резонансного переноса между эксимером и сульфо-Су3 при со-расположении на олигонуклеотидной матрице. Оптимизация структуры зондов

Тем не менее, такая FRET пара требовала детальной оптимизации в составе ДНК-зондов и изучения их флуоресцентных свойств. Используя ранее синтезированные эксимерные молекулярные маяки, мы подобрали последовательность 3'-сульфо-Су3 смежного зонда BP-1 и набор комплементарных матриц ODN1-7 таким образом, чтобы эксимер и сульфо-Су3 располагались на разном расстоянии (**табл. 2.5**). Учитывая, что флуоресценция пирена и его эксимера может значительно тушиться нуклеотидами самого зонда и НК-мишени, несколько матриц было подобрано таким образом, чтобы пиреновый эксимер на 5'-конце зонда отстоял от дуплекса на 12, 6 и 3 нуклеотида (**рис. 2.8**).

Таблица 2.5 Последовательности эксимерных молекулярных маяков MB14, 15, 17, 18 линейного зонда с сульфо-Су3 BP-1 и олигонуклеотидных матриц ODN1-7. Синим и красным цветом отмечены комплементарные участки, подчеркнуты самокомплементарные участки стебля.

Олиго-нуклеотид	Последовательность, 5'→3'
MB14	P1P1- <u>CCGGGG</u> CTCATTTCGAAACGCATTATT <u>ACCCCGG</u> -Dabcy1
MB15	P2P1- <u>CCGGGG</u> CTCATTTCGAAACGCATTATT <u>ACCCCGG</u> -Dabcy1
MB17	P1P2- <u>CCGGGG</u> CTCATTTCGAAACGCATTATT <u>ACCCCGG</u> -Dabcy1
MB18	P2P2- <u>CCGGGG</u> CTCATTTCGAAACGCATTATT <u>ACCCCGG</u> -Dabcy1
BP1	<u>CCCACGACTCGCTCCC</u> -sCy3
BP2	<u>CCCACGACTCGCTCCC</u> -Alkyne
ODN1	TTGAGCGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGGGAG
ODN2	CGGGGTAATGAATGCGTTTCG <u>GGGAGCGAGTCGTGGG</u>
ODN3	CGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGGGGAGCGAGTCGTGGG
ODN4	CGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGCCCGGGAGCGAGTCGTGGG
ODN5	CGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGCCCGGGGGAGCGAGTCGTGGG
ODN6	CGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGCCCGGTTTTTTGGGAGCGAGTCGTGGG
ODN7	CGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGCCCGGTTTTTTTTTTTTGGGAGCGAGTCGTGGG

В свою очередь, ранее было показано, что квантовый выход флуоресценции Су3 увеличивается при связывании с биополимерами, и, особенно, за счет фиксации в двухцепочечной ДНК[60]. Учитывая этот факт, последовательность смежного зонда была выбрана полностью комплементарна матрице, чтобы Су3 был максимально сближен с дуплексом при гибридизации.

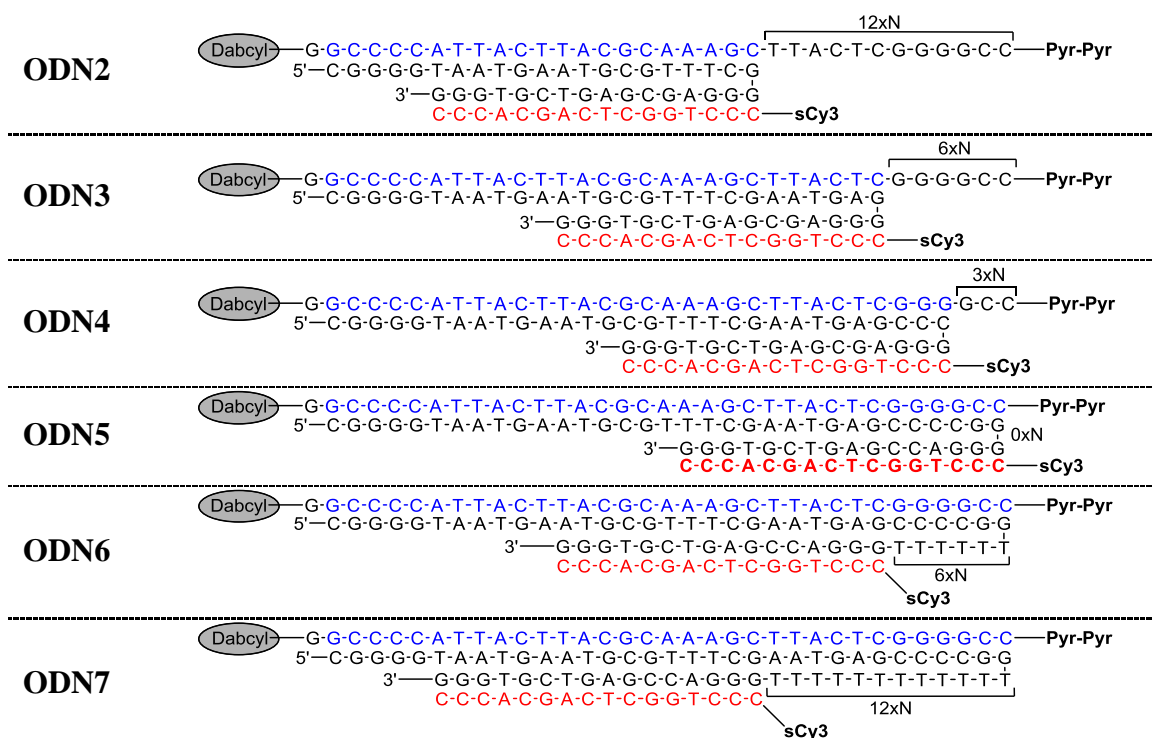


Рис. 2.8 Последовательности зондов и матриц, взаимное расположение пиренового эксимера и Су3 при гибридизации двух зондов на матрице.

Оптимизируя относительную конфигурацию эксимера и цианинового красителя, мы гибридизовали оба зонда MB14, 15, 16, 17 и ВР-1 с различными матрицами в молярном соотношении 1:1:1 и с концентрацией 1 нМ (красные кривые на **рис. 2.9б-з**). Для сравнения использовали систему из трех олигонуклеотидов тех же последовательностей с отсутствующим сульфо-Су3 MB14, 15, 16, 17 и ВР-2 в тех же концентрациях (синие кривые на **рис. 2.9б-з**). Эксперименты проводились параллельно для четырех эксимеров Р1Р1, Р2Р1, Р2Р1 и Р2Р2 для сравнительной оценки каждого из них. В первую очередь, для оценки эффективности работы двух зондов мы руководствовались значениями относительной интенсивности флуоресценции сульфо-Су3 при возбуждении флуоресценции пирена, а также отношениями полезный/фоновый сигнал. За фоновый сигнал нами была выбрана интенсивность флуоресценции обоих зондов на 570 нм в отсутствии матричного олигонуклеотида (**рис. 2.9а**). Симулируя неспецифическое связывание зондов внутри живой клетки, мы также оценили усиление

флуоресценции ДНК-зондов при добавлении 1 экв. матрицы, комплементарной молекулярному маяку также при 570 нм (рис. 2.96). Таким образом, в последнем случае мы получили увеличение фонового сигнала на 570 нм за счет усиления флуоресценции только пиренового эксимера, перекрывающегося с каналом флуоресценции Cy3. Отношения полезный сигнал/фон для каждого из четырех эксимеров и каждой конфигурации зондов приведены в табл. 2.6.

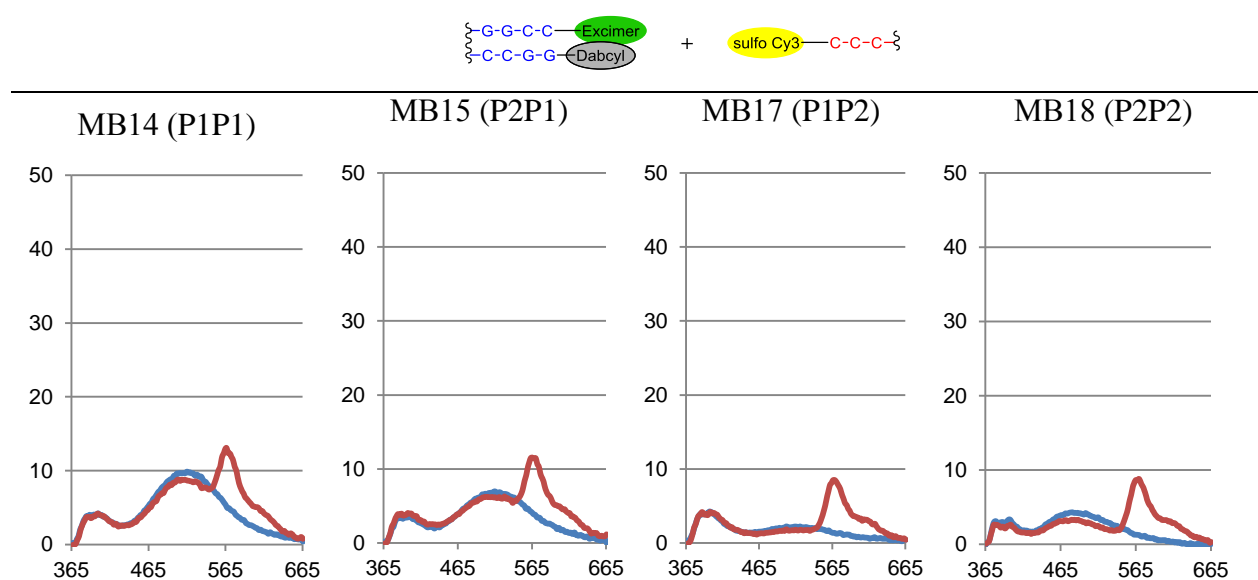


Рис. 2.9а Конфигурация зондов и спектры флуоресценции эксимерных молекулярных маяков и смежного зонда в отсутствии олигонуклеотидной матрицы. Голубые линии MB+BP2, красные линии MB+BP1.

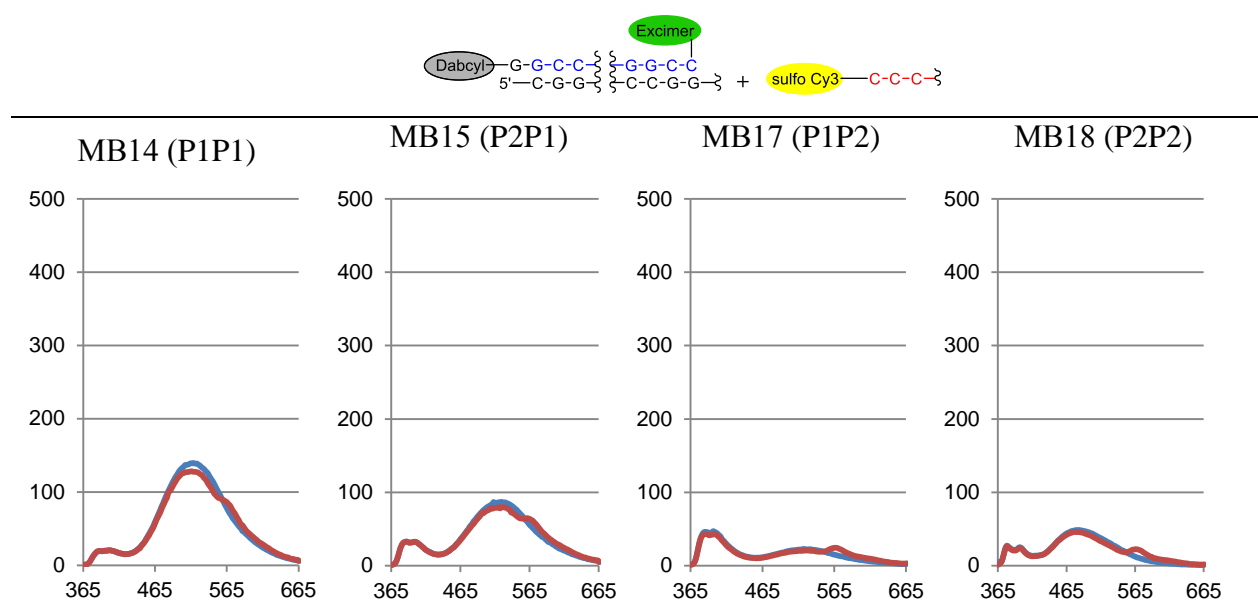


Рис. 2.9б Конфигурация зондов и спектры флуоресценции эксимерных молекулярных маяков и смежного зонда при гибридизации только молекулярного маяка на матрице ODN1. Голубые линии MB+BP2, красные линии MB+BP1.

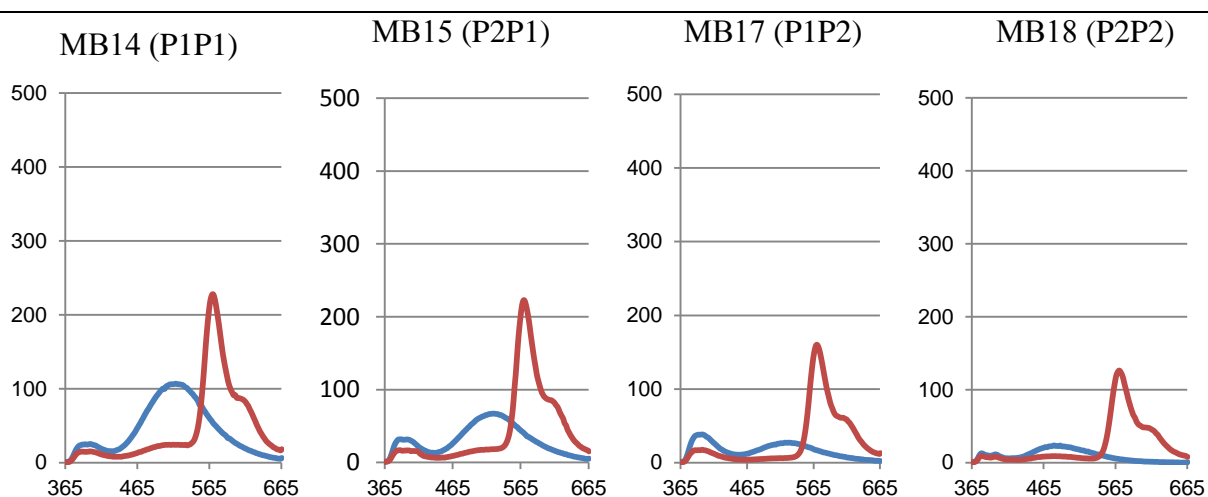
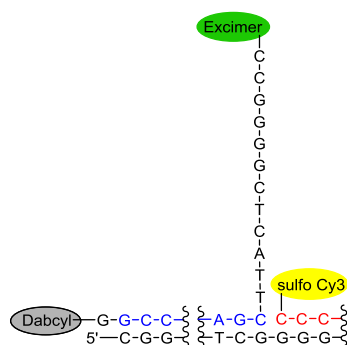


Рис. 2.9в Конфигурация зондов и спектры флуоресценции эксимерных молекулярных маяков и смежного зонда при совместной гибридизации на матрице ODN2. Голубые линии MB+BP2, красные линии MB+BP1.

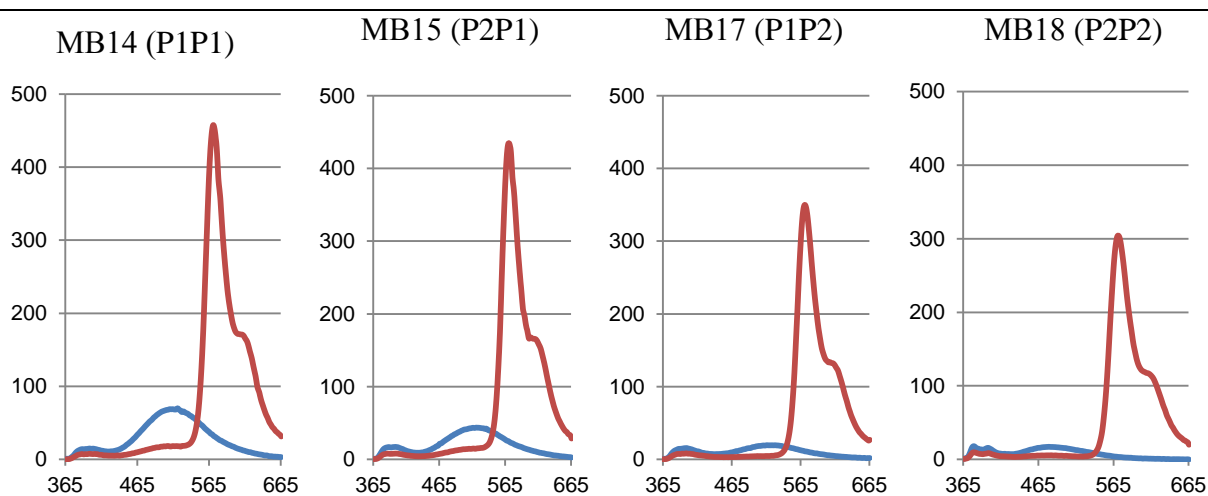
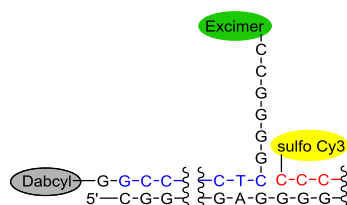


Рис. 2.9г Конфигурация зондов и спектры флуоресценции эксимерных молекулярных маяков и смежного зонда при совместной гибридизации на матрице ODN3. Голубые линии MB+BP2, красные линии MB+BP1.

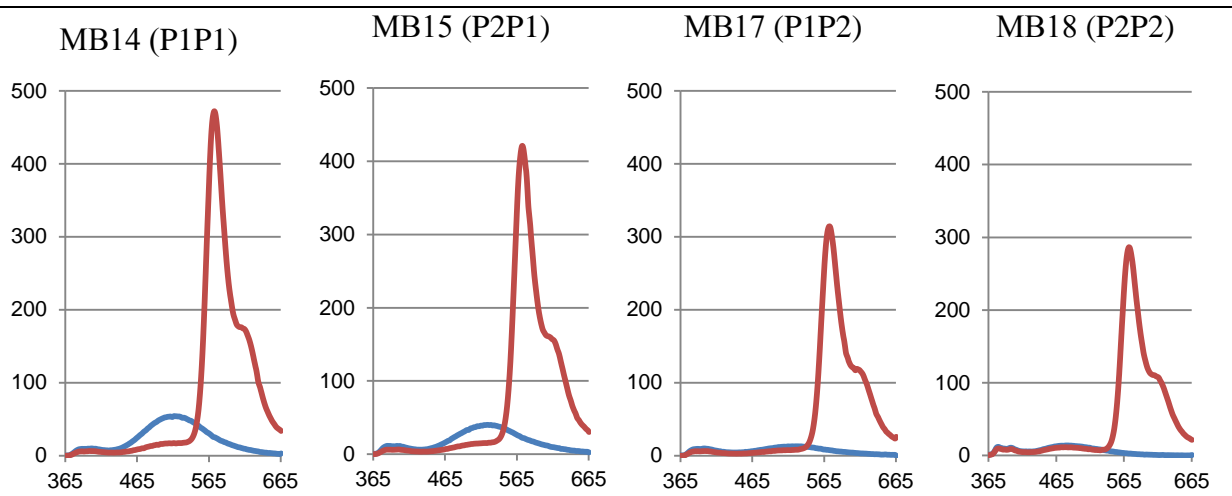
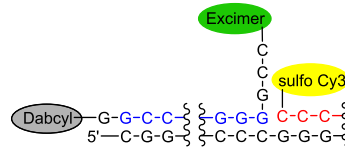


Рис. 2.9д Конфигурация зондов и спектры флуоресценции эксимерных молекулярных маяков и смежного зонда при совместной гибридизации на матрице ODN4. Голубые линии MB+BP2, красные линии MB+BP1.

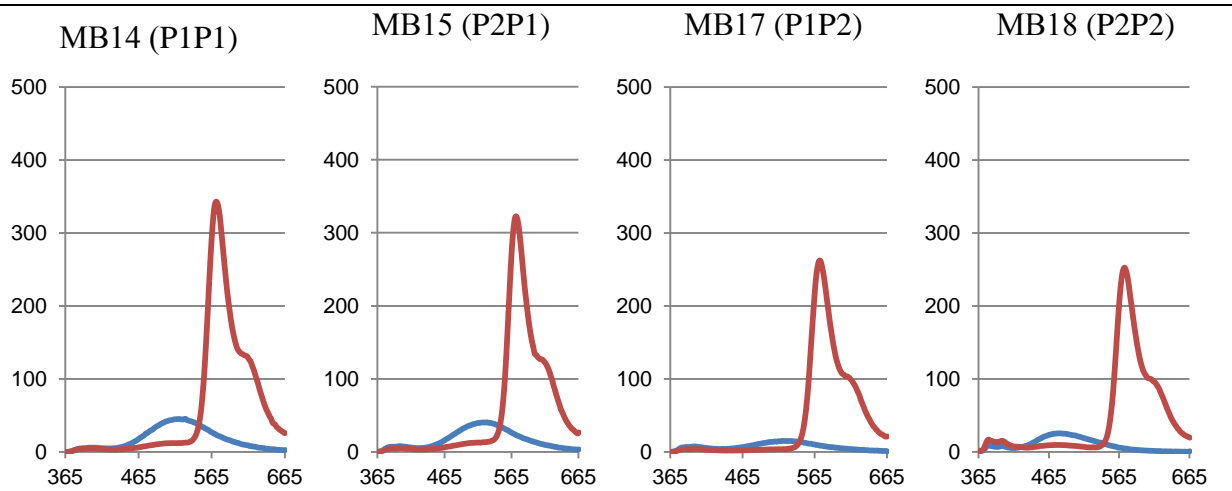
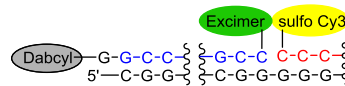


Рис. 2.9е Конфигурация зондов и спектры флуоресценции эксимерных молекулярных маяков и смежного зонда при совместной гибридизации на матрице ODN5. Голубые линии MB+BP2, красные линии MB+BP1.

Как видно из полученных данных (рис. 2.10), относительное увеличение флуоресценции на длине волны 570 нм при гибридизации на матрице слабо выражено с изменением структуры самой эксимерной пары, в отличие от структуры матрицы. Оптимальным расположением эксимера и цианинового красителя СуЗ оказалась конфигурация зондов, при которой СуЗ соседствует с дуплексом, а пиреновая пара отстоит от него на 6 нуклеотидов. Такое расположение донора и акцептора также удобно для нивелирования влияния последовательности матрицы на флуоресценцию красителей, поскольку пиреновые флуорофоры чрезвычайно чувствительны к микроокружению и неоднократно применялись для определения однонуклеотидных полиморфизмов (см. обзор литературы).

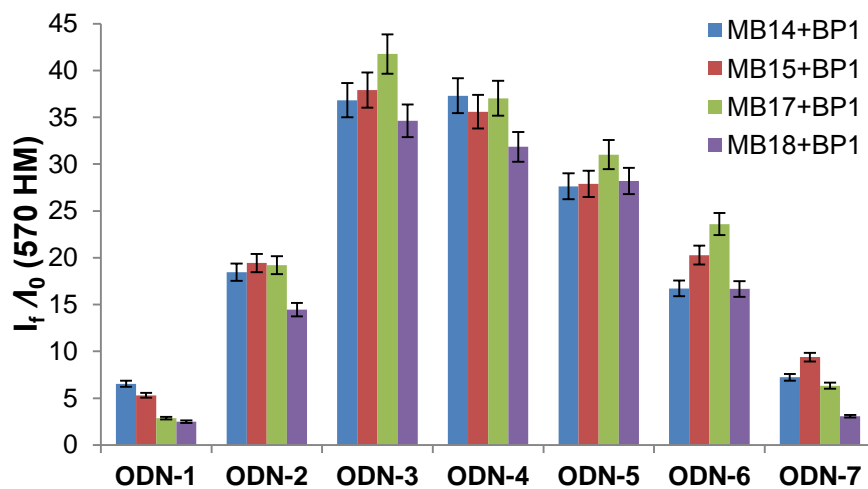


Рис. 2.10 Увеличение интенсивности флуоресценции на масимуме испускания сульфо-СуЗ (570 нм) при совместной гибридизации эксимерных молекулярных маяков и зонда BP-1 на матрицах ODN1-7.

Ранее использование пиренового эксимера во FRET парах было опубликовано в нескольких работах для создания мультихромофорных сенсоров для супрамолекулярного распознавания и ДНК нано-структурах. Однако до сих пор пиреновый эксимер не был использован как Фёрстеровский донор в составе олигонуклеотидных зондов. Более того, в предыдущих работах, очевидно, дизайн структуры эксимерного флуорофора и подбор акцепторной компоненты был проведен неудачно и не оптимизировался. Это следует из профилей флуоресценции эксимера в присутствии и отсутствии акцептора с крайне слабой степенью переноса энергии. В работе [305] описан эксимерный хромофор, образованный фенилэтинилпиреновыми фрагментами, вместе с цианиновым красителем СуЗ. Тушение эксимерной полосы в спектре испускания практически полностью исчезает вместе с усилением флуоресценции СуЗ, однако эксимерный хромофор крайне склонен к фотовыцветанию и ограничен в применении. В работе [306] описана серия олигодезоксифлуорофоров как донорных флуорофоров, корректность формул для расчета

эффективности Фёрстеровского переноса энергии для донорно-акцепторных пар вызывает у нас сомнения. Мы полагаем, учитывая опыт предыдущих работ, использование пиреновых хромофоров может быть крайне эффективно в качестве Фёрстеровского донора через образование эксимера. Являясь антенной, пиреновый маркер способен переносить энергию, поглощенную в УФ-области, на флуорофоры, испускающие в видимом диапазоне. Пиреновый эксимер в составе зондов обладает временем жизни возбужденного состояния ~ 40 нс [120], что примерно на один порядок больше классических флуорофоров: цианиновых, ксантеновых, кумариновых красителей и проч. Количество энергии переносимое от донора к акцептору по механизму FRET, как видно из формулы [VI], может быть оценено из разницы времен жизни донора вместе и отдельно от акцептора. Данный способ оценки эффективности FRET более корректен, чем сравнение квантовых выходов или интенсивностей флуоресценции. Кроме того, условно можно говорить о том, что при высоком времени жизни возбуждения, вероятность переноса энергии на соседние группы повышается. В олигонуклеотидных зондах тушение донора может осуществляться молекулами растворителя, кислорода и проч., нуклеотидами последовательности и, непосредственно, акцепторным флуорофором. Для сравнительной оценки тушения флуоресценции эксимера акцептором СуЗ, мы синтезировали и гибридизовали каждую комбинацию обоих зондов в двух вариантах: с 3'-СуЗ флуорофором и без него. Разницу в амплитуде эксимерной флуоресценции между этими вариациями мы условно обозначили как эффективность тушения E_{quench} . В табл. 2.6 представлены данные E_{quench} для каждой конфигурации красителей и четырех гомологичных эксимеров. Так, несмотря на разную природу пиренового эксимера и различия в спектрах флуоресценции, эффективность тушения в первую очередь зависит от взаимного расположения красителей, а не от природы эксимерного донора.

Таблица 2.6 Параметры FRET: увеличение флуоресценции на длине волны испускания сульфо-Су3, квантовая эффективность сульфо-Су3 при резонансном переносе, эффективность тушения эксимерной флуоресценции сульфо-Су3 при сближении.

МВ _i , (эксимер)	Матрица	Д/А расстояние, нуклеотидов	I_f/I_0^a	Φf^b	E_{quench}^B
МВ14 (P1P1)	ODN1	-	6,5	-	-
	ODN2	+12	18,4	11,6	77,2
	ODN3	+6	36,8	23,4	73,6
	ODN4	+3	37,3	24,1	67,9
	ODN5	0	27,6	17,5	73,2
	ODN6	-6	16,7	10,6	58,9
	ODN7	-12	7,2	4,7	50,8
МВ15 (P1P2)	ODN1	-	5,3	-	-
	ODN2	+12	19,4	13,9	72,5
	ODN3	+6	37,9	27,2	66,3
	ODN4	+3	35,6	26,3	61,8
	ODN5	0	27,9	20,2	68,1
	ODN6	-6	20,3	14,5	64,8
	ODN7	-12	9,4	6,9	50,7
МВ17 (P2P1)	ODN1	-	2,9	-	-
	ODN2	+12	19,2	9,9	76,5
	ODN3	+6	41,8	21,7	76,6
	ODN4	+3	37,0	19,5	39,5
	ODN5	0	31,0	16,3	74,3
	ODN6	-6	23,6	12,2	64,2
	ODN7	-12	6,3	3,3	52,0
МВ18 (P2P2)	ODN1	-	2,5	-	-
	ODN2	+12	14,4	8,5	62,5
	ODN3	+6	34,6	20,5	69,5
	ODN4	+3	31,8	19,3	19,1
	ODN5	0	28,2	17,0	63,1
	ODN6	-6	16,7	9,8	43,6
	ODN7	-12	3,1	1,8	23,7

а) I_f – интенсивность флуоресценции на 570 нм обоих зондов МВ и ВР-1, гибридованных на матрице, I_0 – интенсивность флуоресценции на 570 нм обоих зондов МВ и ВР-1 в отсутствие комплементарной матрицы; б) Φf – квантовая эффективность сульфо-Су3 при возбуждении пирена на длине волны 350 нм; в) $E_{\text{quench}} = 1 - I_{\text{ДА}}/I_{\text{Д}}$ отношение интенсивностей флуоресценции эксимера, при гибридизации обоих зондов на матрице, $I_{\text{ДА}}$ – в присутствии сульфо-Су3, $I_{\text{Д}}$ – без сульфо-Су3.

2.1.7. Определение эффективности FRET от пиренового эксимера к сульфо-Су3

Далее, выявив оптимальную конфигурацию зондов с лучшим соотношением полезный сигнал/фон и увеличением флуоресценции, мы решили более детально определить механизм переноса энергии в нашей системе. Поскольку уже показано, что при концентрации 1 нм обоих зондов излучательного переноса энергии между ними не происходит, очевидно, что при совместной гибридизации на матрице перенос энергии имеет резонансную природу. Мы выбрали оптимальную конфигурацию зондов, при

которой пиреновый хромофор располагается на расстоянии 6 нуклеотидов от двойной спирали, гибридизуясь с матрицей ODN-3 (рис. 2.11). Для всех четырех пиреновых гомологичных пар были измерены времена жизни флуоресценции на максимуме испускания эксимера в отсутствие акцептора сульфо-Cy3 и вместе с ним. В каждом случае амплитуды кривых снижались при переносе энергии на Cy3. Было обнаружено, что кривые затухания флуоресценции от времени имеют двухэкспоненциальную природу, то есть в длинноволновом максимуме испускания пирена присутствует два излучающих состояния хромофора. Эти данные согласуются с литературными. В нескольких работах описывающих природу эксимерной флуоресценции пирена четко отмечается два возможных механизма образования пиренового эксимера: динамический и статический[62,307]. Появление длинноволновой полосы в спектре флуоресценции пирена и его производных характеризуется различным механизмом образования: возбуждения, сближения в пространстве с образованием возбужденного комплекса и полным или частичным перекрыванием пиренов. Регистрация спектров флуоресценции с задержкой во времени показала смещение и изменение формы эксимерного испускания за счет разницы во времени жизни обоих эксимерных состояний.*

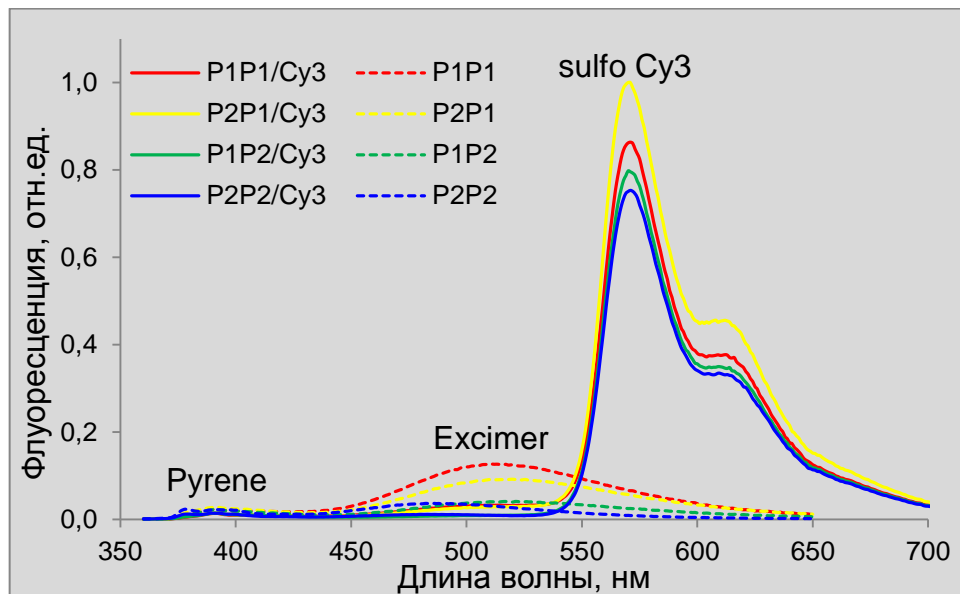


Рис. 2.11[‡] Спектры флуоресценции зондов MB-14,15,17,18 и BP-1 или BP-2, гибридизованных на матрице ODN-3. Зонд BP гибридизовали меченный акцепторным сульфо Cy3 – BP-1 (сплошные линии) или без флуоресцентного красителя – BP-2 (пунктирные линии).

* Для детального понимания этих механизмов можно ознакомиться с содержанием следующих публикаций детально описывающих возможные пути образования пиреновых эксимеров: [62,307,343–346].

[‡] Спектры флуоресценции и возбуждения зарегистрированы на спектрофотометре Fluorolog-3 (Horiba JY).

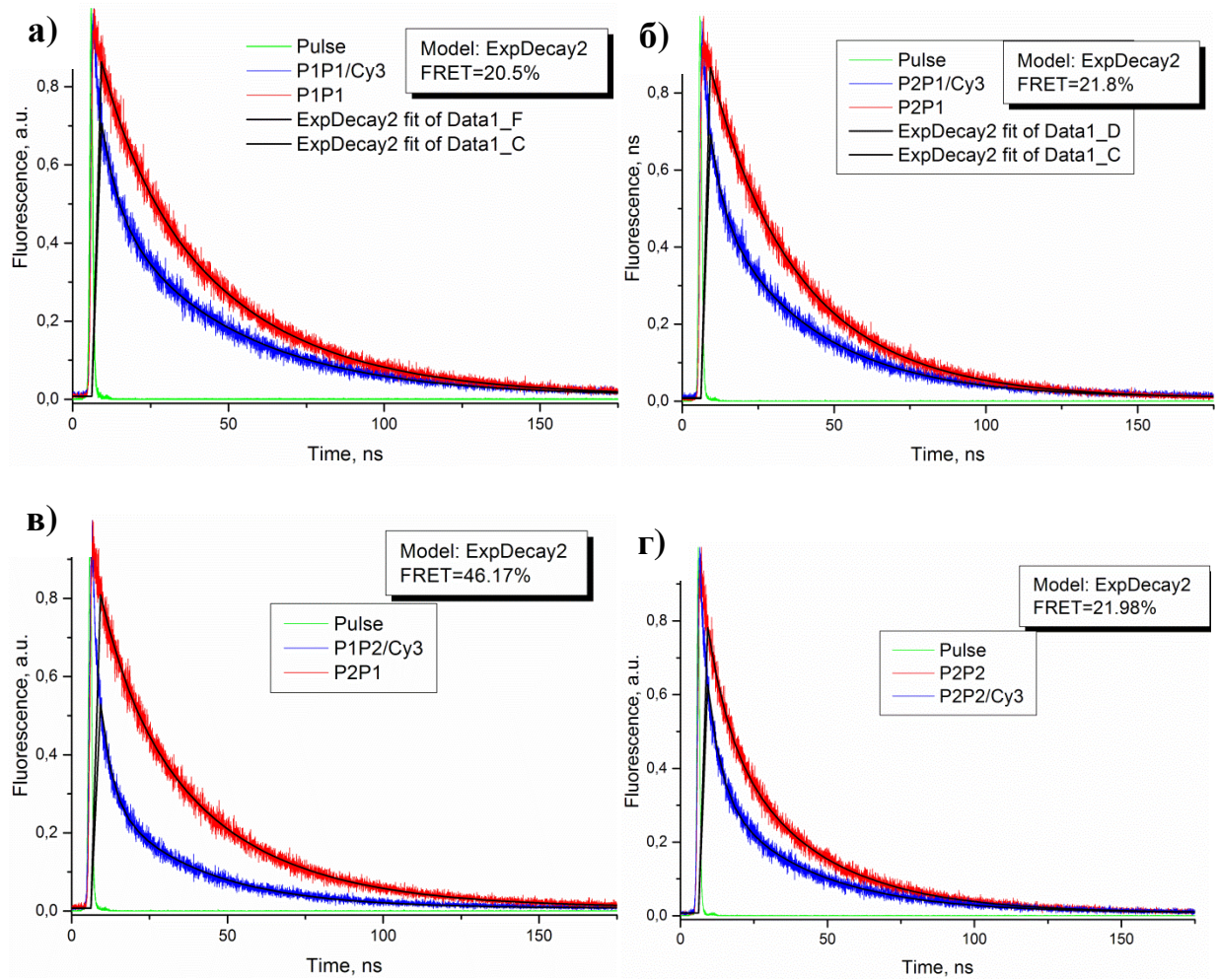


Рис. 2.12 Кинетические кривые флуоресценции: зависимость интенсивности флуоресценции на максимуме эксимера от времени в присутствии и отсутствии акцептора сульфо-Сy3. а) красная кривая – MB14+BP2+ODN3, синяя кривая – MB14+BP1+ODN3; б) красная кривая – MB15+BP2+ODN3, синяя кривая – MB15+BP1+ODN3; в) красная кривая – MB17+BP2+ODN3, синяя кривая – MB17+BP1+ODN3; г) красная кривая – MB18+BP2+ODN3, синяя кривая – MB18+BP1+ODN3.

Таблица 2.7 Времена жизни флуоресценции и эффективность FRET при переносе энергии от пиренов к сульфо-Сy3 в составе гибридизационных конструкций.

Эксимер	α_1	$\tau_{1/2}(\text{excimer}),$ нс	$\langle \tau_{1/2} \rangle,$ нс	α_2	$\tau'_{1/2}(\text{excimer}),$ нс	$\langle \tau_{1/2} \rangle,$ нс	$\lambda_{\text{max}}(\text{excimer})$	η_{FRET}
P1P1	0,17	(I) $12,0 \pm 3,2$	35,0 нс	I 0,28	(I) $5,8 \pm 0,7$	27,8	515 нм	20,5%
	0,72	(II) $40,5 \pm 1,4$		II 0,49	(II) $40,9 \pm 1,1$			
P2P1	0,13	(I) $13,8 \pm 8,1$	30,3 нс	I 0,25	(I) $4,5 \pm 0,7$	23,7	525 нм	21,8%
	0,77	(II) $32,8 \pm 2,0$		II 0,51	(II) $33,1 \pm 0,9$			
P1P2	0,22	(I) $11,2 \pm 11,2$	29,8 нс	I 0,34	(I) $3,8 \pm 0,4$	16,0	520 нм	46,2%
	0,62	(II) $36,4 \pm 1,6$		II 0,29	(II) $30,4 \pm 1,4$			
P2P2	0,31	(I) $7,4 \pm 1,0$	23,1 нс	I 0,38	(I) $4,8 \pm 0,5$	18,0	490 нм	22,0%
	0,54	(II) $32,1 \pm 1,2$		II 0,34	(II) $32,8 \pm 1,4$			

Интересно, что при резонансном переносе уменьшается время жизни только одного из состояний, в то время как для второго оно остается неизменным. Это говорит о том, что только один эксимер выступает донором энергии, в то же время перенос энергии от второго эксимерного состояния оказывается запрещенным. Истинная эффективность резонансного переноса энергии от пиренового эксимера была рассчитана из разницы времен жизни возбужденного состояния, учитывая предэкспоненциальные коэффициенты в аппроксимированном уравнении кривой затухания амплитуды флуоресценции (рис. 2.12). Эффективности переноса энергии составили: 20,5% для P1P1, 21,8% для P2P1, 46,2% для P1P2 и 22,0% для P2P2 (табл. 2.7). Для расчетов эффективности FRET через два изменение времен жизни статистического и динамического эксимеров пользовались формулой [VIII]:

$$\eta = 1 - \frac{\langle \tau_{1/2DA} \rangle}{\langle \tau_{1/2D} \rangle} = 1 - \frac{\sum \tau_{iDA} \alpha_{iDA}}{\sum \alpha_{iDA}} / \frac{\sum \tau_{iD} \alpha_{iD}}{\sum \alpha_{iD}} \quad [\text{VIII}]$$

где τ_{iD} – время жизни возбужденного состояния эксимера, τ_{iDA} – время жизни возбужденного состояния пиренового эксимера в присутствии СуЗ, α_i – предэкспоненциальный коэффициент, $\langle \tau_{1/2D} \rangle$ – усредненное время жизни возбужденного состояния пиренового эксимера, $\langle \tau_{1/2DA} \rangle$ – усредненное время жизни возбужденного состояния пиренового эксимера в присутствии СуЗ.

2.2. Синтез азидопроизводных красителей и их применение для флуоресцентных ДНК-зондов

Использование реакции Хьюсгена-Мельдаля-Шарплесса (Cu(I)AAC) давно стало высокоэффективной альтернативой другим методам введения маркера в ДНК-зонд. Ацилирование первичной аминогруппы на олигонуклеотидах требует больших избытков активированных эфиров и часто протекает не полностью. Фосфамидитные производные красителей, используемые непосредственно в олигонуклеотидном синтезе, гораздо менее доступны, чем азидопроизводные и активированные эфиры красителей. Более того, жесткие условия деблокирования олигонуклеотида и удаления с твердофазного носителя происходит в экстремальных для большинства красителей условиях, также как и некоторые стадии синтетического цикла.

2.2.1. Библиотека функциональных азидопроизводных для твердофазного мечения олигонуклеотидов

Ключевым методом пост-модификации синтетических олигонуклеотидов служит медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение – Cu(I)AAC. Реакция Хьюсгена–Мельдаля–Шарплесса была открыта в 2001 году независимо в двух группах[308,309]. С тех пор она была подробно изучена и описана. Азид-алкиновое присоединение применялось широко не только для создания строительных блоков и библиотек соединений в органической химии, но также и как метод модификации биополимеров[310,311]. За счет своей простоты в исполнении, эффективности и быстроты протекания эта реакция стала рутинным инструментом в синтезе флуоресцентных ДНК-зондов. Тем не менее, без детальной оптимизации условий протекания, реакция в значительной мере может протекать с образованием побочных продуктов или с низкими выходами. Увеличение количества медного катализатора и проведение реакции в инертной атмосфере увеличивает скорость реакции и снижает вероятность побочных реакций. С другой стороны, было показано, что соли одновалентной меди могут оказывать пагубное влияние на олигонуклеотидный каркас[312]. До сих пор востребованы универсальные протоколы для модификации синтетических олигонуклеотидов Cu(I)AAC для увеличения производительности синтеза зондов в академических и промышленных лабораториях. Мы постарались оптимизировать условия этой «клик»-реакции с олигонуклеотидами в твердофазном варианте с участием библиотеки востребованных функциональных производных.

С этой целью мы отобрали и синтезировали ряд азидопроизводных содержащих флуоресцентные красители, биотин **15** и холестерин **14** (рис. 2.13). Поскольку следующая

часть работы связана с подбором «голубого» флуоресцентного маркера для ПЦР зондов, в первую очередь мы провели синтез азидопроизводных красителей с испусканием в сине-зеленой области спектра. Среди них – производные пирена **10** и **11**, перилена **12**, фенилэтинилпирена **13**, кумарина 343 **9**, а также карбоксифлуоресцеина (FAM) **8a** и **8b** как наиболее популярного маркера для ДНК-зондов.

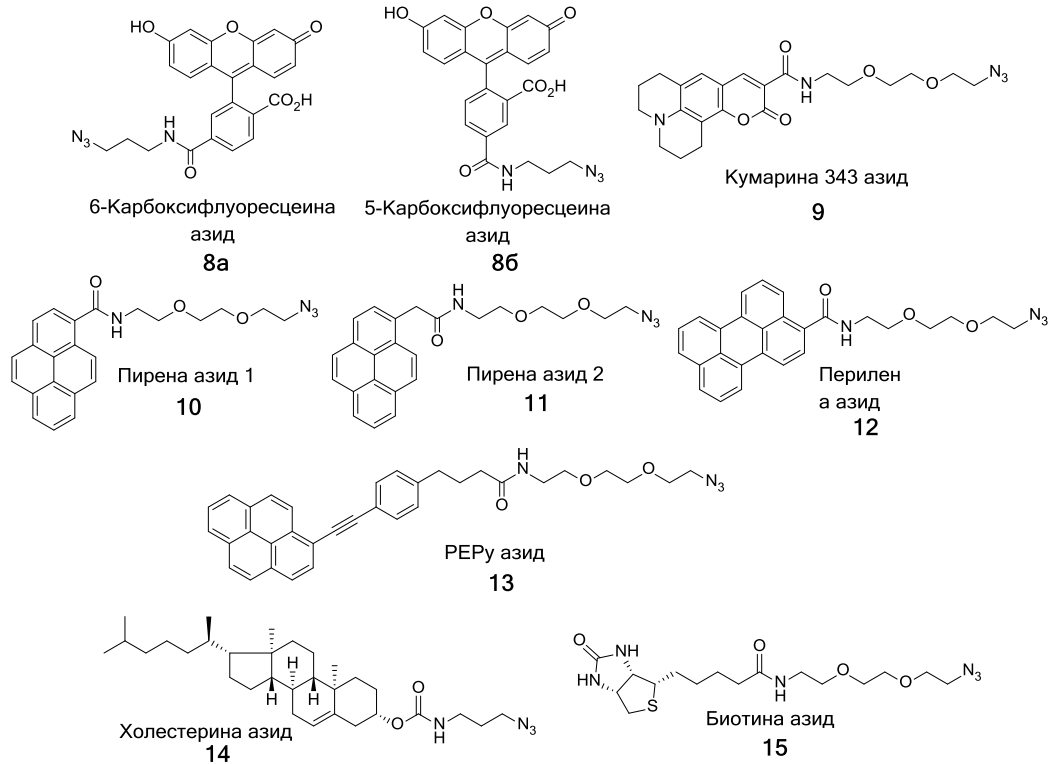


Рис. 2.13 Синтезированные функциональные азидопроизводные.

Синтез дивалоилкарбоксифлуоресцеинов осуществляли в соответствии с методикой, описанной в работе [313]; региоизомерные производных **16a** и **16b** разделяли перекристаллизацией их диизопропиламмонийных солей с последующим переводением в свободные карбоновые кислоты. Анализ чистоты соединений **16a** и **16b** проводили дополнительно методом ВЭЖХ, для обоих изомеров чистота составила более 95% (**рис. 2.14**). Последующие превращения на **рис. 2.15** проводили с индивидуальными региоизомерами.

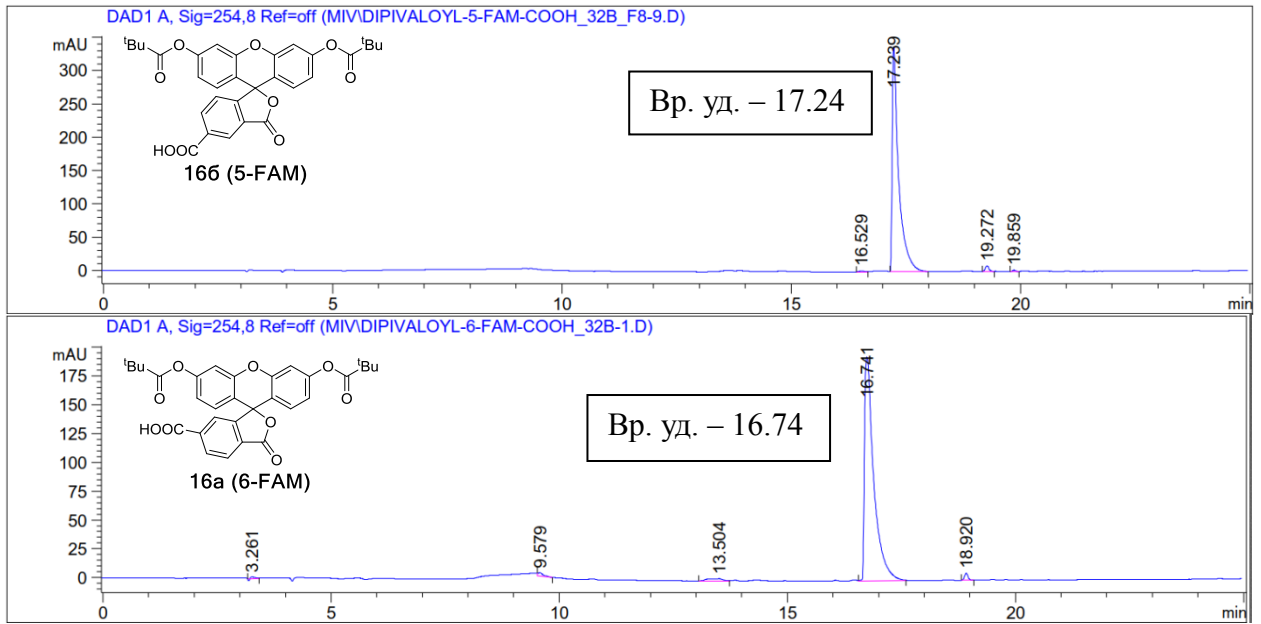


Рис. 2.14 ВЭЖХ профили индивидуальных соединений **16a** и **16b** на обращенной фазе C8. Элюент А: H₂O/ацетонитрил/1М ТЕАА (рН 6.0) 47,5/50/2,5 v/v/v. Элюент Б: H₂O/ацетонитрил/1М ТЕАА (рН 6.0) 19/80/1 v/v/v. Градиент: 0 мин элюент А → 15 мин элюент Б → 20 мин 100% ацетонитрил.

Далее синтез азидопроизводных флуоресцеина осуществляли в соответствии со схемой, представленной на **рис. 2.15**. Пивалоильная защитная группа позволяет, во-первых, разделить 5-FAM и 6-FAM изомеры карбоксифлуоресцеина, во-вторых, переводит флуоресцеин в закрытую лейко-форму, позволяя провести конденсацию избирательно по одной карбоксильной группе.

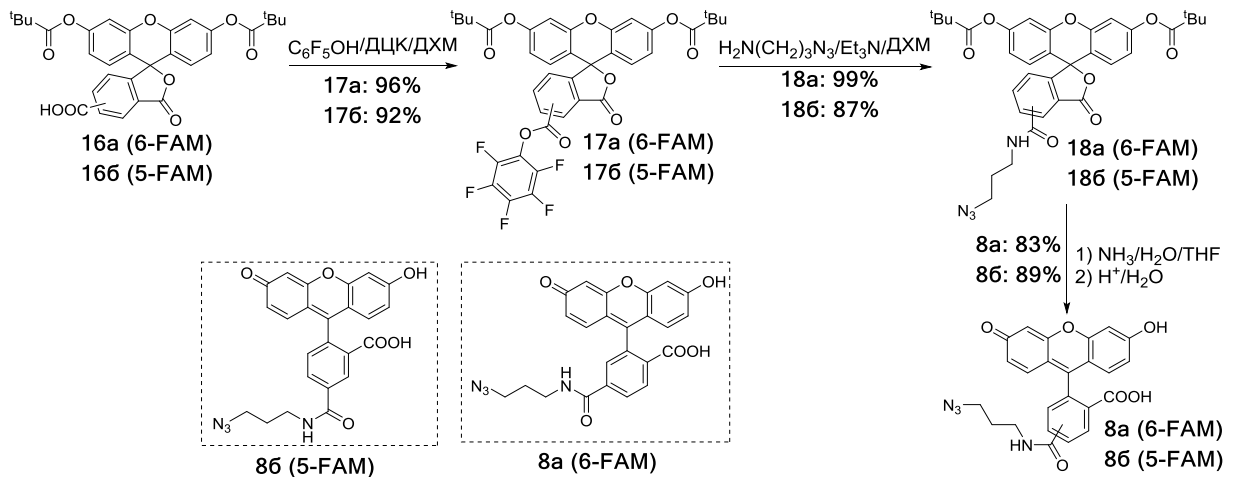


Рис. 2.15 Схема синтеза азидопроизводных карбоксифлуоресцеина (5-FAM) **8b** и (6-FAM) **8a**.

Для получения олигонуклеотидных конъюгатов нами были выбраны производные пирена, перилена, фенилэтинилпирена. Ранее они неоднократно зарекомендовали себя в качестве флуоресцентных маркеров для ДНК-зондов. В многочисленных работах было показано, что полиароматические флуорофоры, введенные на коротких линкерах в

олигонуклеотидные зонды, способны взаимодействовать с их последовательностью, особенно с двухцепочечными ДНК (табл. 1.5). Результатом этого является сильное снижение квантового выхода флуоресценции и, в некоторых случаях, увеличение стабильности дуплекса. Для предотвращения возможной интеркаляции между парами оснований или связывания с малой бороздкой был выбран гидрофильный линкер **20**, синтезированный из триэтиленгликоля (рис. 2.16).

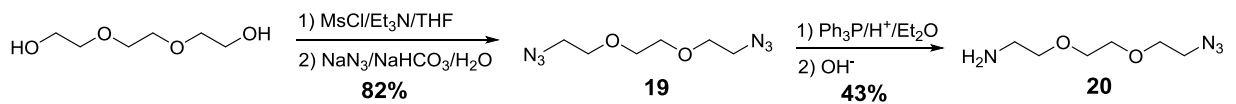


Рис. 2.16 Схема синтеза аминоазидного линкера **20**.

Синтез аминоазида **20** (Рис. 2.16) осуществляли обработкой триэтиленгликоля мезилхлоридом, полученный ди-*O*-мезилтриэтиленгликоль без выделения превращали в диазид. Восстановление одной азидогруппы до амина проводили по реакции Штаудингера в слабокислой среде обработкой трифенилфосфином. Целевое соединение очищали хроматографически на силикагеле. Затем получали ряд азидопроизводных путем ацилирования аминоазида **20** соответствующими пентафторфениловыми эфирами красителей и биотина (рис. 2.13). Азидопроизводное холестерина **14** синтезировали из *O*-хлоркарбонилхолестерина и 3-азидопропиламина. 4-(4-(Пирен-1-илэтинил)фенил)бутановую кислоту **21** синтезировали из 1-этинилпирена и *n*-иодфенилмасляной кислоты по реакции Соногаширы; продукт затем конденсировали с амином **20** в одну стадию (рис. 2.17). Активацию полиароматических карбоновых кислот проводили при помощи пентафторфенола и ДЦК при охлаждении, пентафторфениловые эфиры ПАУ очищали водной экстракцией и последующей флеш-хроматографией.

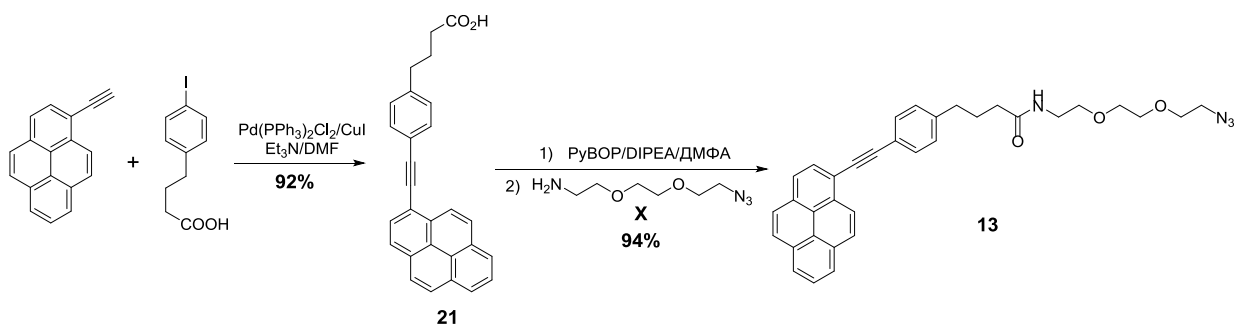


Рис. 2.17 Схема синтеза РЕРу азида **13**.

2.2.2. Применение функциональных азидопроизводных для твердофазной модификации олигонуклеотидов

Твердофазный способ модификации олигонуклеотидов после синтеза последовательности позволяет снизить время получения зонда и повысить его выход за

счет сокращения промежуточных этапов выделения (**рис. 2.18**). Олигонуклеотидный синтез и модификация азидами проводилась сотрудниками МГУ им. М.В. Ломоносова Валентиной Михайловной Фарзан и Тимофеем Сергеевичем Зацепиным, ими был протестирован ряд растворителей и катализаторов для «клик»-реакции. Типичные смеси растворителей *t*-BuOH/вода и DMSO/вода, используемые для Cu(I)AAC с участием олигонуклеотидов, оказались чрезмерно вязкими средами для введения реагентов через инжектор в олигонуклеотидном синтезаторе. Далее использовали апротонные полярные растворители: формамид, ацетонитрил, ДМСО, ДМФА и диметилацетамид. К сожалению, формамид и ацетонитрил слабо растворяли некоторые азидопроизводные, поэтому их пришлось исключить. В качестве катализаторов были протестированы различные соли меди(I) и ее комплексы: CuCl, Cu(MeCN)₄PF₆, CuI/DIPEA, CuCl×TBTA, CuBr×PhSMe, CuBr×TBTA и CuI×P(OEt)₃. При участии трех последних выход в реакции достигал 95% и более. Оптимальным катализатором для азид-алкинового циклоприсоединения оказался CuI×P(OEt)₃, а растворителем – диметилацетамид; реакции с их участием показали самые высокие выходы.

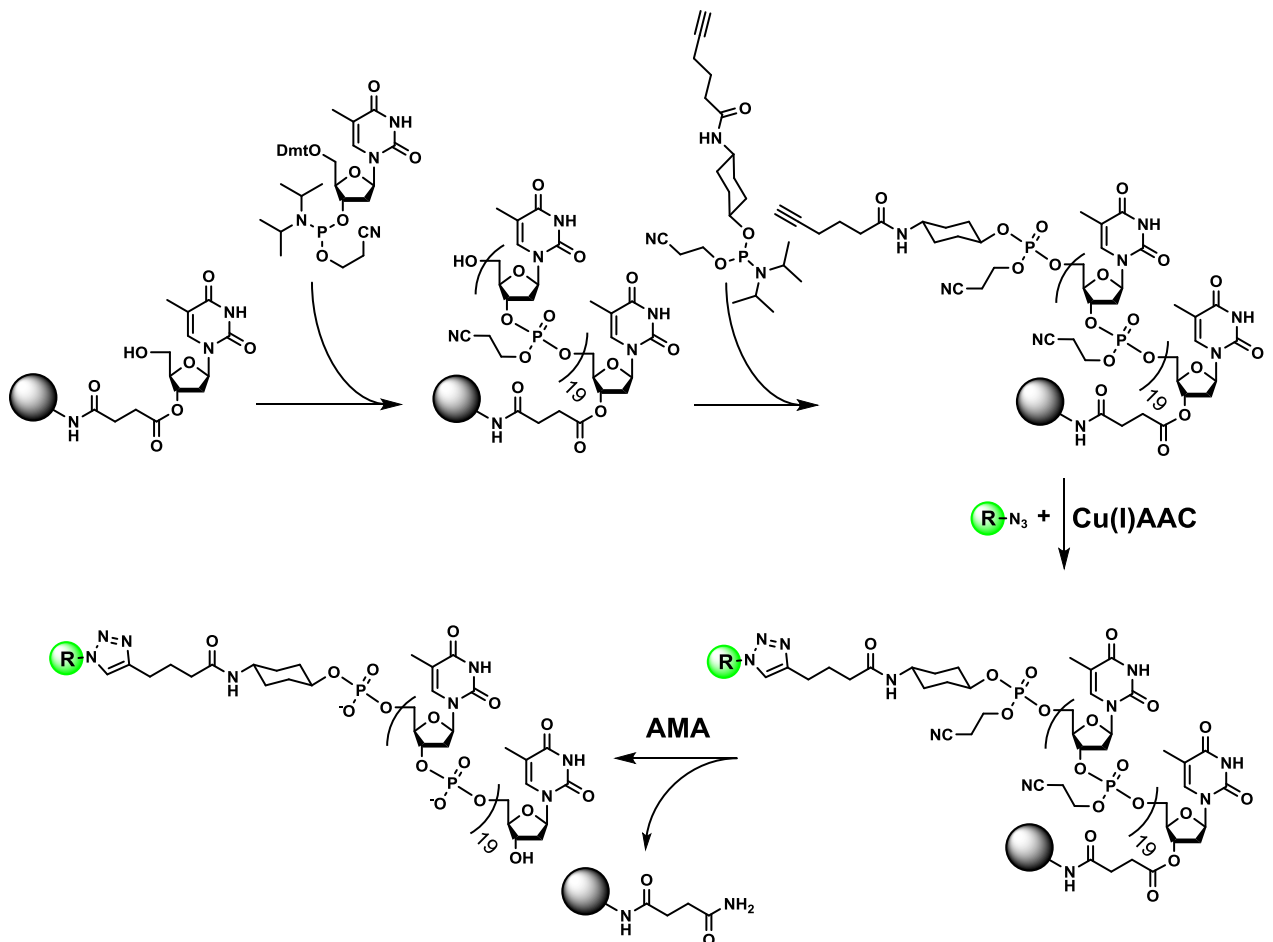


Рис. 2.18 Схема твердофазного синтеза, Cu(I)AAC модификации и деблокирования алкиновых олигонуклеотидов азидопроизводными.

Таблица 2.8 Выходы конъюгатов модельных олигонуклеотидов 5'-Alkyne-(dT)₂₀ в реакции Cu(I)AAC с функциональными азидами на твердой фазе.

Олигонуклеотид	Функциональная группа	Азид	Конверсия, ^a %
dT20-R6G	Родамин 6G	--	>95
dT20-FAM	Флуоресцеин	8a	>95
dT20-Coum 343	Кумарин 343	9	0–20 ^c
dT20-Pyr1	Пиренкарбоксамид 10	10	>95
dT20-Pyr2	Пиренацетамид 11	11	>95
dT20-Per	Периленкарбоксамид 12	12	>95
dT20-PERy	1-Фенилэтинилпирен (PERy) 13	13	>95
dT20-Chol	Холестерин 14	14	>95
dT20-Biotin	Биотин 15	15	>95

^aконверсия была рассчитана из ВЭЖХ-МС данных трех повторов

Производное кумарина оказалось неустойчиво в условиях деблокирования олигонуклеотида, целевой олигонуклеотид составлял небольшую часть реакционной смеси и не был выделен. Для выделения конъюгата с кумарином реакцию проводили жидкофазно на очищенном олигонуклеотиде. Остальные производные были получены с высокими выходами и охарактеризованы методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии (**Приложение 1**).

2.2.3. PERy – новый маркер для кПЦР

Огромный спектр приложений флуоресцентных ДНК-зондов обуславливает множество их структур и модификаций. Пожалуй, наиболее востребованным методом определения последовательностей НК служит ПЦР в реальном времени. Флуоресцентные зонды выступают в качестве альтернативы ДНК-связывающим красителям Sybr Green I, Eva Green и др. в количественном ПЦР. Использование нескольких зондов с разными последовательностями и флуоресцентными маркерами, испускающими в разных спектральных диапазонах, позволяет детектировать несколько ДНК-мишеней параллельно и проводить полуколичественное сравнение их копий. Набор флуоресцентных маркеров для мультиканального варианта кПЦР, доступных на сегодняшний день сильно лимитирован. Некоторые ПЦР-амплификаторы оснащены «голубым» каналом детекции для увеличения мультиплексности анализа: Stratagene Mx3005P с возбуждением 350 нм и детекцией 440 нм и Qiagen Rotor-Gene Q с возбуждением 365 нм и детекцией 460 нм. Маркерами для «голубого» канала, как правило, выступают производные кумарина: AMCA, Alexa fluor 350, Pacific Blue и Dy-350. Они сильно уступают по яркости ксантоновым и цианиновым красителям, используемым для других каналов детекции: FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5. Несмотря на высокий квантовый выход кумаринов,

например, для 7-аминокумарина (АМСА) $\sim 0,75$, их коэффициенты молярного поглощения не превышают $20000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Кроме того, кумарины абсолютно не совместимы с фосфамидитным методом синтеза олигонуклеотидов. Они не выдерживают условий аммонолиза и деградируют при удалении олигонуклеотида с твердой подложки. Это сильно ограничивает их применение в качестве олигонуклеотидных маркеров. Альтернативой кумаринам могли бы стать полиароматические углеводороды, производные пирена и перилена. Они превосходят АМСА и Alexa fluor 350 по коэффициентам экстинкции более чем в 2 раза при сравнимых квантовых выходах.

2.2.3.1. Модификация олигонуклеотидных зондов

Синтезированное азидопроизводное РЕПу **13** вводилось к последовательности зонда в ходе твердофазного олигонуклеотидного синтеза (рис. 2.19). Для этого к 5'-концу последовательности конденсировали фосфамидит с терминальной тройной связью. Азид-алкиновое циклоприсоединение проводили на твердой фазе, при катализе солью Cu(I). Затем зонд удаляли с пористого стекла и очищали на C-18 обращенной фазе методом ВЭЖХ. Для модификации кумаринами олигонуклеотидов использовали коммерчески-доступные активированные эфиры NHS АМСА и Alexa fluor 350, ацилируя 5'-терминальный 6-амино-*n*-гексанол в составе синтезированной последовательности в жидкой фазе. Очистку проводили аналогичным образом.

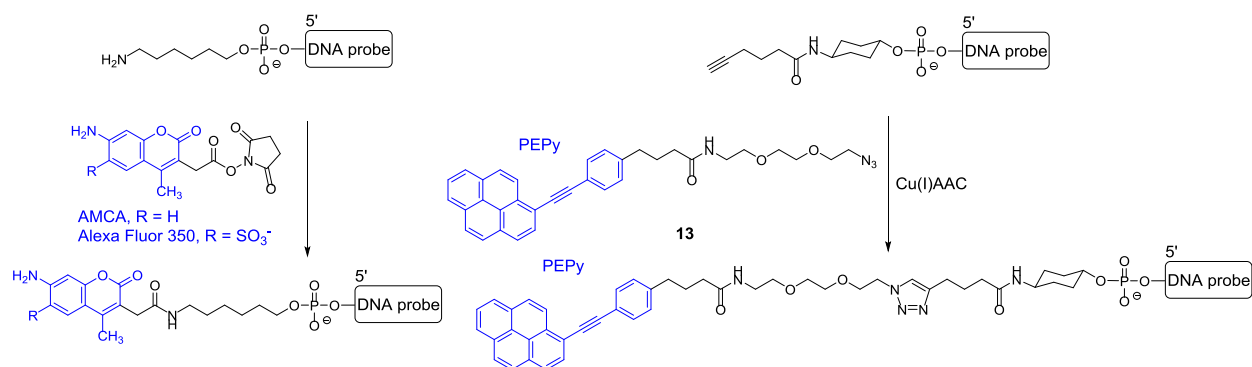


Рис. 2.19 Схема модификации синтезированных последовательностей NHS эфирами аминокумаринов АМСА и Alexa Fluor 350, а также РЕПу азидом по реакции Хьюсгена–Мельдаля–Шарплесса.

2.2.3.2. Изучение флуоресценции РЕПу в олигонуклеотидных зондах

Поскольку пиреновые производные способны за счет диполь-дипольных взаимодействий передавать часть энергии возбуждения нуклеиновым основаниям, мы решили сравнить чувствительность флуорофоров РЕПу и АМСА к различным комбинациям соседних нуклеотидов. Так, было синтезировано 4 коротких олигонуклеотидных последовательности, в которых флуорофор на 5'-конце соседствовал с

А, Т, G или С нуклеотидом. Четыре флуоресцентных последовательности с АМСА и РЕРу гибридизовали с четырьмя полностью или частично комплементарными матрицами со свисающими 3'-концами для симуляции взаимодействия маркеров с длинными ПЦР-амплификатами (табл. 2.9: зонды 8 и 9, матрица 10А, Т, G или С). Для флуоресцентных олигонуклеотидов и их дуплексов с матрицами определяли квантовые выходы флуоресценции, значения которых для зондов с РЕРу имели больший разброс и в среднем оказались ниже, чем для АМСА. При этом, учитывая молярные коэффициенты поглощения на максимуме длины волны возбуждения обоих красителей, яркость флуоресценции РЕРу ($\epsilon \times \Phi_f$) превышала АМСА в среднем в 2 раза (рис. 2.20).

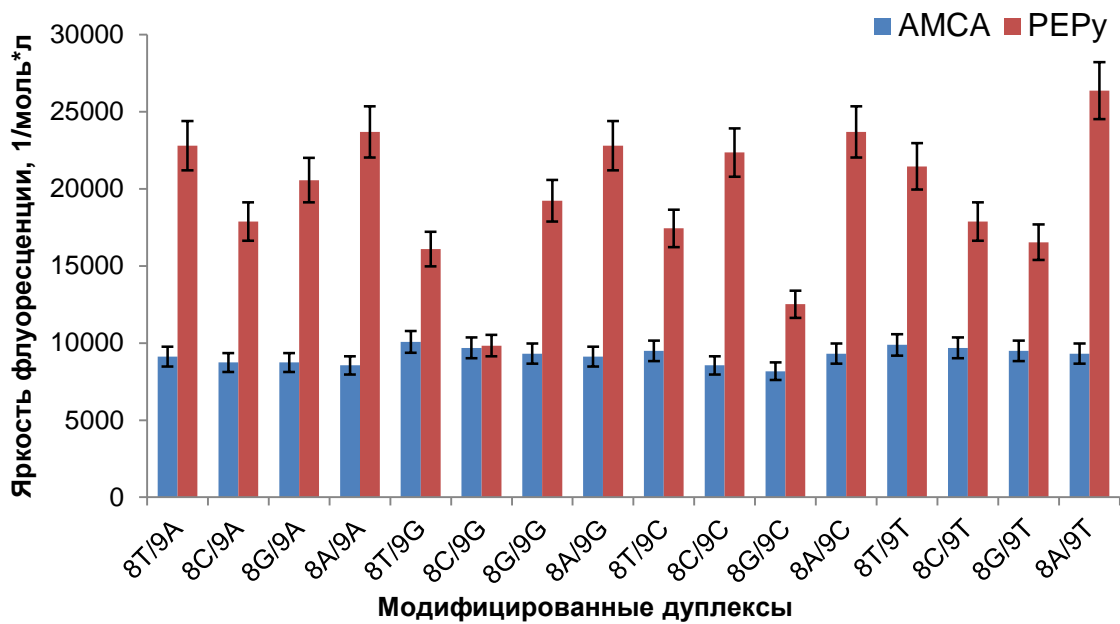


Рис. 2.20 Сравнение яркости флуоресценции ($\epsilon \times \Phi_f$) АМСА и РЕРу в составе дуплексов, зависимость от соседней пары нуклеотидов. Нуклеотиды дуплекса ближайшие к флуорофору обозначены в подписях.

Таблица 2.9 Последовательности зондов с АМСА и РЕРу и матриц, квантовые выходы флуоресценции и яркость флуоресценции.

ODN	Олигонуклеотиды 8 (5'→3') и их дуплексы с мишенями 9	X = АМСА		X = РЕРу	
		Φ _f , %	ε×Φ _f , М ⁻¹ ×см ⁻¹	Φ _f , %	ε×Φ _f , М ⁻¹ ×см ⁻¹
8A	X-ААССС ^А АСТГААГСАГСА	58±4	11000±800	63±4	28000±1800
8T	X-ТАССС ^А АСТГААГСАГСА	52±3	9900±700	47±3	21000±1700
8C	X-САССС ^А АСТГААГСАГСА	55±3	10500±700	51±3	23000±1600
8G	X-ГАССС ^А АСТГААГСАГСА	61±4	11600±800	52±3	23000±1600
8A/9A	X-ААССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^А ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	45±3	8600±600	53±3	23700±1600
8T/9A	X-ТАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^А ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	48±3	9100±600	51±3	22800±1600
8C/9A	X-САССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^А ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	46±3	8700±600	40±3	17900±1200
8G/9A	X-ГАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^А ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	46±3	8700±600	46±3	20600±1400
8A/9T	X-ААССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Т ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	49±3	9300±600	59±3	26400±1800
8T/9T	X-ТАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Т ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	52±3	9900±700	48±3	21500±1500
8C/9T	X-САССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Т ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	51±3	9700±700	40±3	17900±1200
8G/9T	X-ГАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Т ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	50±3	9500±600	37±2	16500±1100
8A/9C	X-ААССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^С ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	49±3	9300±600	53±3	23700±1600
8T/9C	X-ТАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^С ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	50±3	9500±600	39±3	17400±1200
8C/9C	X-САССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^С ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	45±3	8600±600	50±3	22400±1500
8G/9C	X-ГАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^С ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	43±3	8200±600	28±2	12500±900
8A/9G	X-ААССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Г ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	48±3	9100±600	51±3	22800±1600
8T/9G	X-ТАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Г ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	53±3	10100±700	36±2	16100±1100
8C/9G	X-САССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Г ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	51±3	9700±700	22±2	9800±700
8G/9G	X-ГАССС ^А АСТГААГСАГСА АСАААСАТА ^Г ТГГГТТГАСТТЦГТЦГТ	49±3	9300±650	43±3	19200±1300

Некомплементарные нуклеотиды в последовательности указаны красным цветом. Измерения проводили при концентрации $3,0 \times 10^{-07}$ М зондов в гибридационном буфере (1М PBS, pH 7.0) при 20°C. Длины волн возбуждения/детекции флуоресценции: 365/442 нм (АМСА), 365/420 нм (РЕРу).

Так как детекция флуоресценции в ПЦР в реальном времени происходит при температуре отжига праймеров, следовало изучить влияние температуры на интенсивность флуоресценции обоих красителей. Для этого регистрировали спектры флуоресценции двух модельных политимидиновых олигонуклеотидов с красителями РЕРу и АМСА при комнатной температуре и 60°C (рис. 2.21 сплошная и пунктирная

линии). Так, при повышении температуры на 40°C, квантовый выход флуоресценции PEру снизился на 27%, в то время как интенсивность АМСА упала более чем вдвое – на 55%.

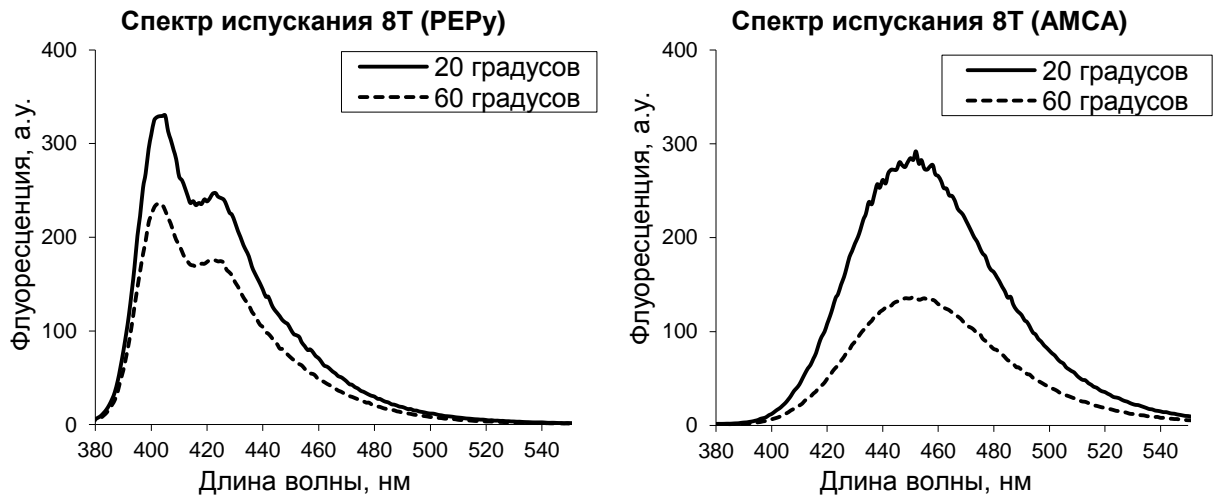
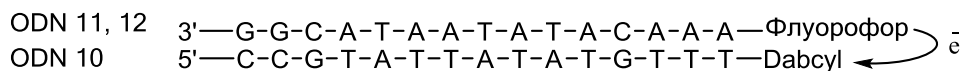


Рис. 2.21 Флуоресцентные спектры политимидинового олигонуклеотида, меченного PEру и АМСА. Олигонуклеотиды в концентрации 3.0×10^{-7} М в гибридизационном буфере (PBS, pH 7.0), длина волны возбуждения 365 нм.

Для применения флуоресцентных зондов для кПЦР важна не только яркая флуоресценция маркера, но и увеличение интенсивности флуоресценции при гибридизации с мишенью. Для сравнительной оценки эффективности тушения флуоресценции мы сконструировали систему модифицированных комплементарных олигонуклеотидов (**рис. 2.22**). Флуоресцентный маркер вводили в 5'-положение зонда, а комплементарный ему содержал в 3'-положении тушитель – Dabcyl. В одном случае тушитель находился плотно к АМСА или PEру, а в другом на расстоянии 10 нуклеотидов. Проведенные эксперименты моделируют тушение флуоресценции в негибридизованной форме зонда по контактному и FRET механизмам. Данные, полученные для зондов с PEру практически совпадают с АМСА, контактное тушение составило 77% (PEру)/87% (АМСА), а Фёрстеровское - 56% (PEру)/52% (АМСА) (**табл. 2.10**). Т.о., по эффективности тушения оба флуоресцентных маркера практически идентичны друг другу.

а) Контактное тушение (I)



б) Тушение по механизму FRET (II)

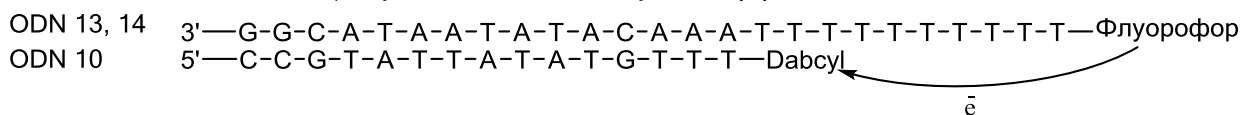


Рис. 2.22 Схематическое изображение расположения красителя и тушителя в дуплексе, соответствующее контактному и Фёрстеровскому механизму тушения.

Таблица 2.10 Квантовые выходы АМСА- и РЕРу-меченных олигонуклеотидов и эффективности тушения комплементарным зондом с азокрасителем Dabcyl.

Механизм тушения	Маркер	ODN	Квантовые выходы, %	Эффективность тушения, %
I	РЕРу	11	52±3	77±4
		10/11	12±1	
II		13	41±2	56±4
		10/13	18±1	
I	АМСА	12	53±3	87±5
		10/12	7±1	
II		14	33±2	52±3
		10/14	16±1	

2.2.3.3. Сравнение маркера РЕРу с аминокумаринами в качестве флуоресцентных меток зондов для кПЦР

Доказав преимущество РЕРу по яркости флуоресцентного сигнала по сравнению с кумарином АМСА, мы решили апробировать РЕРу флуорофор на зондах в сравнении с кумаринами в кПЦР. ПЦР в реальном времени проводил сотрудник Центрального НИИ эпидемиологии Ольга Александровна Веселова. В качестве мишени выступали клонированные VP4 и VP7 фрагменты генома Р и G ротавирусов в векторе рGem-t. Праймеры для амплификации VP4 (889 по) и VP7 фрагментов (947 по), а также детектируемые последовательности показаны в **табл. 2.11**.

Таблица 2.11 Последовательности праймеров для ПЦР.

Праймеры пр/обр	Последовательность, 5'→3'	Зонд	Расположение в GenBank
VP4	TAAAATGGCTTCGCTCATTTATAGACA		
VP4	GGTTATAAATGGTCCGAAATATCATATA		
VP7	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG		
VP7	TCAACTACAGTATAAAATACTTGCCACCA		
4P385	GAGAATAAGCAGTTTAACGTAGA	15	379-401 (M32559)
2T1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC		494-474 (M32559)
8P214	CCTTATCARCCTACTACATTTAC	16	210-232 (M21014)
1-T1m	GATCTACTGGATTAACGTGC		336-356 (M21014)
1G86	GATATCAATCATTCTACTCAAC	17	87-108 (M21843)
1G310	GATTTGAGTACTTGCTTCAGT		327-307 (M21843)
9T2	GTTAGAAATGATTCTCCTACT	18	281-262 (U73974)
2G170	CTCTGATATCACCATTTGTG		173-192 (U73974)
9T3P	GTCCAGTTGCAGTGTAGC	19	501-484 (AF161823)
3G276	CCTAACTTCGACTTTATGTT		276-295 (AF161823)
9T4	GGGTCGATGGAAAATTCT	20	423-440 (D86284)
4G319	ССААСТСАААТТАГТГАСАС		707-726 (D86284)

Нами был проведен дизайн шпилечных зондов, комплементарных мишени, содержащих маркер 5'-PEPу, 5'-Alexa fluor 350 и 5'-AMCA и тушитель 3'-Dabcyl. Для того, чтобы предотвратить нежелательное тушение PEPу нуклеотидами матрицы зонды использовались в режиме TaqMan, т.е. после гибридизации зонда с мишенью происходила его деградикация Taq-полимеразой, а флуорофор и тушитель в результате разделяются. Поскольку тушение по механизму FRET оказалось менее эффективно чем контактное, последовательность зонда была увеличена за счет 3'-самокомплементарного участка для образования шпилечной структуры и более плотного взаимодействия пары красителей (**Приложение 11**).

Анализируя нормализованные ПЦР-графики после проведения ПЦР, мы сравнивали уровень плато фоновой и конечной флуоресценции. Регистрация проводилась при 55°C. Для всех зондов с PEPу фоновая флуоресценция оказалась ниже, а конечная - значительно выше (**табл. 2.12**). Сниженный фоновый сигнал зондов меченных PEPу может быть результатом более тесного гидрофобного взаимодействия полиароматического флуорофора с азобензольным тушителем. Поскольку увеличение флуоресцентного сигнала PEPу превосходит AMCA-меченные зонды, это имеет ключевое значение для чувствительности анализа. С одной стороны разница количества флуоресцентных зондов пропорциональна разнице фоновой и конечной флуоресценции, т.е. 5'-PEPу зондов необходимо в несколько раз меньше, чем меченных кумаринами для того же уровня флуоресценции. Кроме того, значения пороговых циклов - C_t для PEPу оказались на 2,5–6 единиц ниже, чем для AMCA (**табл. 2.13**). Это означает, что количество определяемой последовательности ДНК при прочих равных условиях для PEPу и AMCA отличается в $n \times ((1-2)^{2,5} - (1-2)^6)$ раз, где $n = 1-2$ – эффективность ПЦР цикла, т.е. отличается вплоть до 64 раз. Все синтезированные зонды и меченые олигонуклеотиды были проанализированы ВЭЖХ и масс-спектрометрически (**Приложение 3**).

Таблица 2.12 Последовательности флуоресцентных ДНК-зондов для кПЦР и значения нормировочного увеличения флуоресценции. X: PEPy, AMCA или Alexa fluor 350.

Зонд	Последовательность зонда, 5'-3'	Нормированное увеличение флуоресценции*		
		PEPy	Alexa 350	AMCA
15	X-CACTCTGACTACTACCTTTAAACAGAGCG-Dabcyl	0,14±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01
16	X-GGACTGCAGTCRRTTGCTGTTGAAC-Dabcyl	0,15±0,01	0,06±0,01	0,04±0,01
17	X-CTGAGCTTTAGTYAAGGCAAATAATGCTCAG-Dabcyl	0,10±0,01	0,08±0,01	0,04±0,01
18	X-CAGCGTCTAGTGATCCCGTTATTGGC-Dabcyl	0,13±0,01	0,12±0,01	0,09±0,01
19	X-TACCCAACCTGAAGCAGCAACAGGGTA-Dabcyl	0,16±0,01	0,08±0,01	1,5±0,01
20	X-CTGAACYTGTCGGCCATCCTTTGGTT-Dabcyl	19,5±0,01	24,5±0,01	1,3±0,01

*Данные получены вычитанием плато фоновой флуоресценции из конечной флуоресценции после кПЦР.

Таблица 2.13 Зависимость порогового цикла ПЦР (Ct) от количества копий матричной ДНК для каждого зонда меченого PEPy, AMCA или Alexa fluor 350. Разницы пороговых циклов зондов с PEPy и меченных кумаринами.

Зонд	кПЦР данные					
	Кол-во копий ДНК мишени	Cq (PEPy)	Cq (AMCA)	Cq (Alexa350)	ΔCq (Ct _{AMCA} -Ct _{PEPy})	ΔCq (Ct _{Alexa350} -Ct _{PEPy})
15	10 ¹⁰	18,9±0,4	21,6±0,3	21,6±0,2	2,7±0,4	2,7±0,3
	10 ⁸	25,8±0,3	28,9±0,2	26,9±0,3	3,1±0,3	1,1±0,3
	10 ⁶	32,8±0,2	35,9±0,3	35,0±0,4	3,1±0,3	2,2±0,4
	10 ⁴	40,5±0,3	41,9±0,3	42,5±0,3	1,4±0,3	2,0±0,3
	10 ²	-	-	-	-	-
16	10 ¹⁰	11,0±0,4	15,7±0,4	14,4±0,4	4,7±0,3	3,4±0,4
	10 ⁸	18,4±0,3	22,6±0,3	21,3±0,3	4,2±0,3	2,9±0,3
	10 ⁶	24,8±0,4	28,9±0,2	27,7±0,4	4,1±0,4	2,9±0,4
	10 ⁴	31,9±0,3	36,0±0,3	34,2±0,3	4,1±0,3	2,3±0,3
	10 ²	38,7±0,4	41,5±0,3	40,1±0,3	3,8±0,4	1,4±0,4
17	10 ¹⁰	10,6±0,3	14,5±0,3	12,0±0,3	3,9±0,3	1,4±0,3
	10 ⁸	19,2±0,2	21,9±0,3	19,9±0,3	2,7±0,3	0,7±0,3
	10 ⁶	26,7±0,3	28,9±0,3	27,1±0,3	2,2±0,3	0,4±0,3
	10 ⁴	34,1±0,3	35,9±0,3	35,0±0,3	1,8±0,3	0,9±0,3
	10 ²	43,3±0,3	44,4±0,3	>45	1,1±0,3	>1,7
18	10 ¹⁰	11,5±0,3	14,1±0,3	13,8±0,3	2,6±0,3	2,3±0,2
	10 ⁸	19,3±0,3	20,9±0,3	19,9±0,3	1,6±0,3	0,6±0,3
	10 ⁶	25,6±0,3	26,9±0,3	26,5±0,3	1,3±0,3	0,9±0,3
	10 ⁴	32,3±0,3	33,7±0,3	33,4±0,3	1,4±0,3	1,1±0,3
	10 ²	38,8±0,3	41,0±0,3	39,5±0,3	2,2±0,3	0,7±0,3
19	10 ¹⁰	10,5±0,3	11,4±0,3	11,1±0,3	0,9±0,3	0,8±0,3
	10 ⁸	17,1±0,3	19,2±0,3	17,9±0,3	0,8±0,3	0,8±0,3
	10 ⁶	24,0±0,3	25,9±0,3	24,6±0,3	1,9±0,3	0,6±0,3
	10 ⁴	30,9±0,3	32,9±0,3	31,4±0,3	0,5±0,3	0,5±0,3
	10 ²	36,8±0,3	40,2±0,3	39,5±0,3	3,4±0,3	2,7±0,3
20	10 ¹⁰	12,7±0,3	15,0±0,3	14,8±0,5	2,3±0,5	2,1±0,3
	10 ⁸	19,2±0,3	21,3±0,3	21,5±0,3	2,1±0,3	2,3±0,3
	10 ⁶	25,6±0,3	27,6±0,3	27,7±0,3	2,0±0,3	2,1±0,3
	10 ⁴	32,6±0,3	34,7±0,3	34,5±0,3	2,1±0,3	1,9±0,3
	10 ²	39,1±0,3	41,3±0,3	41,0±0,3	2,2±0,3	1,9±0,3

2.3. Конъюгация иммуноглобулинов с олигонуклеотидами

Моноклональные антитела и конъюгаты на их основе обрели широчайшее применение в медицине при терапии заболеваний, серологических методах диагностики, а также в лабораторных методах анализа. Высокое сродство антител к определенному типу мишени делает их незаменимым инструментом в локальной доставке карго по принципу «магической пули», сформулированному Паулем Эрлихом, и детектировании антигенов различной природы. Конъюгаты иммуноглобулинов с олигонуклеотидами, в свою очередь, также применяются в различных областях. Антитела выступают направляющими молекулами для доставки олигонуклеотидов внутрь живой клетки, в том числе для терапии антисмысловыми РНК[314,315]. Олигонуклеотидный фрагмент в составе таких конъюгатов может служить меткой (матрицей или праймером) для проведения ПЦР и амплификации сигнала детекции за счет образования множественных копий ДНК. Этот принцип лежит в основе методов иммуно-ПЦР[316–319] и анализа сближенного лигирования (proximity ligation assay, PLA)[320,321]. Также олигонуклеотид может выступать линкерной группой для иммобилизации антитела на твердой поверхности[314,322] или образования наноструктур[323] за счет гибридизации с образованием дуплекса.

Для связывания антител с ДНК использовались как высокоаффинная пара биотин/стрептавидин, так и ковалентная конъюгация химическими методами. Несмотря на доступность биотинилированных антител и олигонуклеотидов, наличие четырех сайтов связывания биотина в молекуле стрептавидина(авидина) приводит к невоспроизводимости стехиометрия состава этих конъюгатов. Тем не менее, такие супрамолекулярные комплексы в настоящее время широко используются. Альтернативным подходом к конъюгации является образование ковалентной связи между молекулами. Так, к биомолекулам отдельно вводятся реакционноспособные функциональные группы в составе кросс-сшивающих реагентов, или, в ходе олигонуклеотидного синтеза в составе модифицированного мономера, а затем проводят избирательную химическую реакцию между этими группами. В ходе такой конъюгации образуется устойчивая ковалентная связь между олигонуклеотидом и антителом. В качестве методов ковалентной конъюгации наибольшее распространение получили тиол-малеимидная реакция и образование оснований Шиффа. Однако обе реакции обладают недостатками: тиольные группы склонны к быстрой димеризации, что приводит к необходимости использования восстановителей, таких как ТСЕР или ДТТ, малеимид способен дезактивироваться, присоединяя воду и другие нуклеофилы, а основания Шиффа чувствительны к рН среды и

могут обратимо гидролизироваться. В последние годы для целей конъюгации белков активно разрабатываются методы «клик»-химии, особенно «безмедные» варианты реакций. К сожалению, для контроля протекания мечения функциональными группами иммуноглобулинов приходится прибегать к дополнительным стадиям и анализам, а конечные конъюгаты с олигонуклеотидами, как правило, и вовсе не анализируются. Соединение олигонуклеотидов с иммуноглобулинами и прочими белками через ковалентную связь является наиболее надежным и перспективным подходом, однако процедуры такого связывания недостаточно проработаны на настоящий момент и требуют детального рассмотрения.

2.3.1. Синтез реагентов для конъюгации иммуноглобулинов с олигонуклеотидами

Для ковалентного введения азидогрупп в иммуноглобулины по остаткам лизинов нами предложена структура на основе кросс-сшивающего линкера **31**, содержащего в своем составе цианиновой краситель сульфо-Су5 (**рис. 2.24**). Флуоресцентный краситель Су5 обладает высоким коэффициентом молярного поглощения в красной области спектра ($\sim 250000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ при 650 нм), примерно таким же, как и полноразмерные антитела человека ($\sim 204000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ при 280 нм). Кроме того, полосы поглощения белковых антител и красителя Су5 не перекрываются и сильно отстоят друг от друга в спектральном диапазоне, что позволяет количественно оценивать степень мечения антитела и, соответственно, количество введенных азидогрупп в пересчете на одну молекулу антитела. Такой подход должен обеспечить простой анализ стехиометрии полученного конъюгата без дополнительных тестов и титрований.

Вариант проведения конъюгации в отсутствие катализатора более предпочтителен для конъюгации олигонуклеотидных меток с антителами. Это связано с рядом побочных процессов, протекающих в случае с медь-катализируемым вариантом реакции. Во-первых, для реакции Cu(I)AAC необходима инертная атмосфера, в присутствии кислорода и солей Cu(I) терминальные ацетилены способны к окислительной димеризации и другим побочным реакциям. Во-вторых, соли Cu(II) обладают высоким сродством к амидным связям и способны хелатироваться белками, особенно при повышенных значениях pH, а аскорбиновая кислота, типичный восстановитель сульфата меди (II), при окислении за счет образования дикето-формы становится реакционноспособной в отношении некоторых аминокислот, особенно аргинина[324]. Для модификации антител, как правило, используют введение более стабильной азидогруппы, а терминальный алкин вводят к олигонуклеотидам. При этом, при проведении Cu(I)AAC-конъюгации, побочным продуктом реакции может являться окисленный димер олигонуклеотида, который берут в

избытке в расчете на количество реакционно-способных групп антитела. Присутствие медного катализатора и аскорбиновой кислоты может вызвать денатурацию антитела и деградацию олигонуклеотидного маркера. Во избежание этого, для конъюгации белковых молекул используют водорастворимые лиганды (например ТНРТА), а к реакционной смеси добавляют аминогуанозин для связывания дегидроаскорбиновой кислоты[324]. Тем не менее, последнее время внимание исследователей концентрируется на вариантах азид-алкинового циклоприсоединения не требующих медного катализа и инертной атмосферы и прочих биоортогональных реакциях для модификации иммуноглобулинов. Несмотря на то, что на сегодняшний день в литературе редко встречаются методы конъюгации антител и олигонуклеотидов, основанные на биоортогональных реакциях, они являются наиболее перспективным инструментом создания устойчивой ковалентной связи, а использование реакционных групп не встречающихся в живой природе, т.е. биоортогональных, обеспечивает избирательность протекания реакции между олигонуклеотидом и антителом.

Для конъюгации иммуноглобулинов нами было выбрано азид-алкиновое циклоприсоединение, не требующее катализатора, поскольку присутствие солей меди может привести к денатурации антитела и выпадению его в осадок[324]. Протекание реакции в отсутствие солей Cu(I) достигается за счет тройной связи в составе напряженного восьмичленного (реже семичленного) цикла. Реакция циклооктина с органическим азидом была открыта Виттигом и Крёбсом в 1961 г [325]. Второе рождение реакция получила в начале XXI в благодаря К. Бертоцци и ее концепции протекания химической конъюгации в живых организмах – биоортогональным реакциям. Так, оказалось, что замещенные циклооктины и азидопроизводные могут избирательно реагировать друг с другом, давая целевой продукт, даже в живых организмах. На сегодняшний день существует множество реакционноспособных производных циклооктина. Их синтезу, реакционной способности и применению посвящены несколько обзоров[326–328]. Исходя из схем синтеза, реакционной способности и стабильности производных циклоалкинов нами был выбран активированный эфир азидабензоциклооктина (ADIBO NHS) **28**. Синтез активированного эфира **28** проводили в несколько стадий, исходя из дибензосуберенона и полуэфира адипиновой кислоты (рис. 2.23). Далее его применяли для пост-модификации олигонуклеотида.

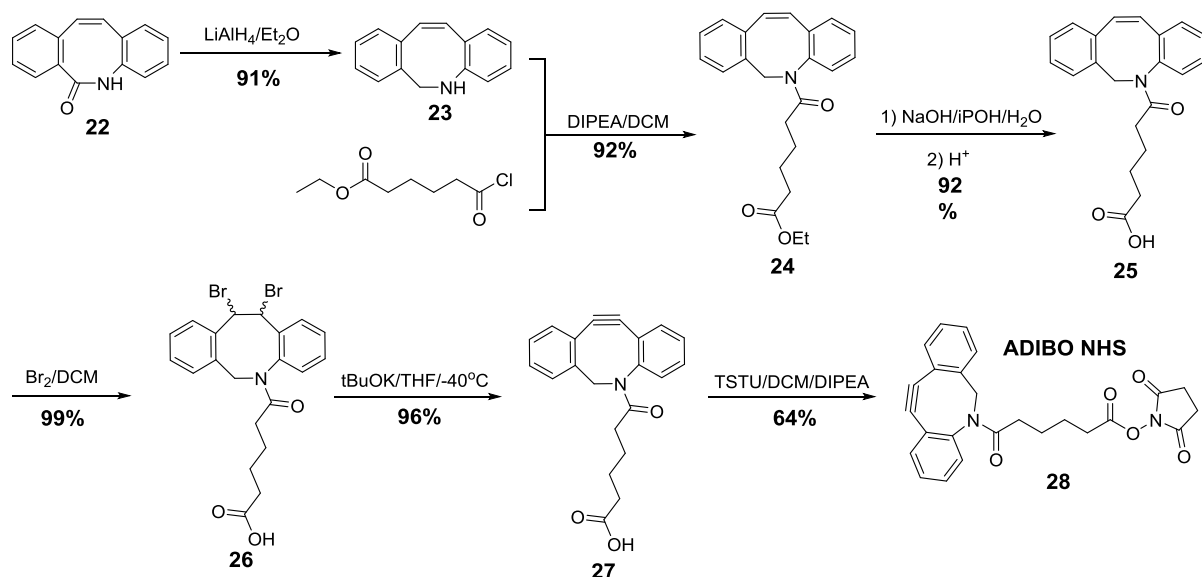


Рис. 2.23 Схема синтеза ADIBO NHS 28.

Для введения азидогруппы через цианиновый краситель Су5 синтезировали соединение **31** (рис. 2.24). Сульфированный индолинин и анид малондиальдегида синтезировали по описанным методикам, далее получали симметричный цианиновый краситель **29** с двумя функциональными карбоксильными группами. Соединение **29** конденсировали с аминоазидом **20** и получили статистическую смесь из диазида **30б**, моноазида **30а** и исходной дикарбоновой кислоты **29**, которую разделяли хроматографически на силикагеле. Наличие триэтиламмония в качестве противоиона позволяет сульфированным цианинам растворяться во многих полярных растворителях и делает их пригодными для очистки с помощью хроматографии на силикагеле. Однако неоднократно отмечалось, что активированные эфиры заряженных красителей в форме аммонийных солей в качестве противоиона, менее стабильны, чем в форме солей металлов. Поэтому после выделения соединения **30а** из полученной смеси, триэтиламмоний обменивали на ионы калия, пропуская через катионит Dowex 50WX8 в дистиллированной воде и затем тщательно высушивая от следовых количеств влаги. Активацию карбоновой кислоты **30а** в NHS эфир проводили уже в форме калийной соли, осаждая продукт **31** сухим ацетоном с количественным выходом. Коэффициент молярного поглощения синтезированного соединения Су5 **31** оказался $250000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, такой же как и для других производных красителей сульфо-Су5, описанных в литературе [77,301].

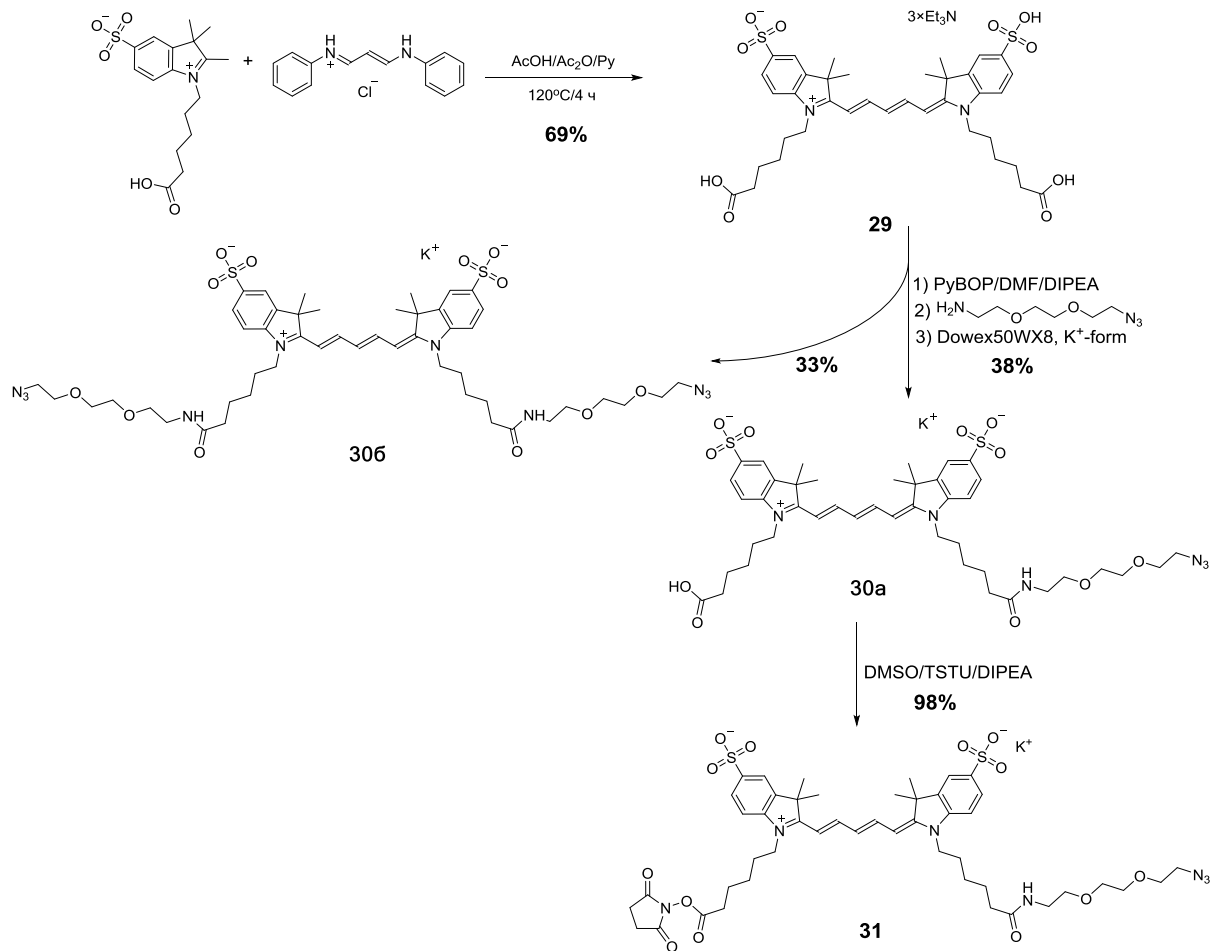


Рис. 2.24 Схема синтеза кросс-сшивающего реагента сульфо-Сy5 азид/NHS эфир.

2.3.2. Мечение моноклонального антитела кросс-сшивающим реагентом на основе сульфо-Сy5

Активированный эфир Сy5 **31** содержит две сульфогруппы, за счет чего растворим в воде и не склонен к неспецифическим гидрофобным взаимодействиям с белковыми глобулами. Для модификации иммуноглобулина G готовили 10 мМ стоковый раствор соединения **31** в свежабсолютизированном ДМСО, который добавляли к раствору белка в PBS при слабощелочном pH 7.4 (**рис 2.25**).

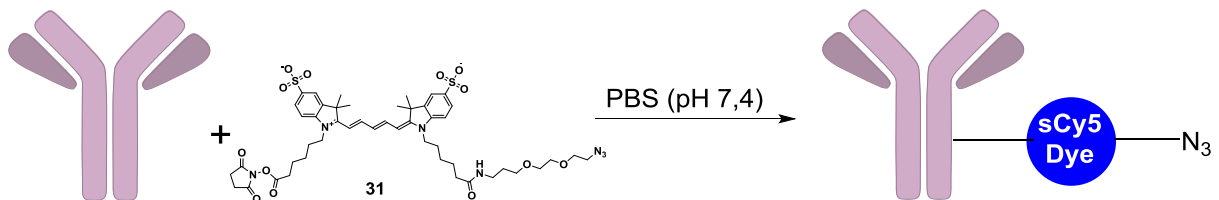


Рис. 2.25 Формальная схема ковалентной модификации иммуноглобулина сульфо-Сy5 азид/NHS эфиром.

Таким образом, введение остатка **31** через образование амидной связи с белком происходит в мягких условиях: инкубация в физиологическом буфере при комнатной

температуре в течение нескольких часов. Затем модифицированное антитело осаждали равным объемом 4М водным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и отделяли от непрореагировавшего красителя гель-хроматографией на колонках NAP-5 или NAP-10. Также возможно быстрое выделение конъюгата из реакционной смеси ультрафильтрацией на специальных мембранных фильтрах. После очистки модифицированный иммуноглобулин перерастворяли в PBS или Трис-боратном буфере, степень протекания модификации оценивали по соотношению максимумов полос поглощения на 280 нм против 650 нм в УФ-видимом диапазоне, используя формулу [IX]:

$$\eta = \frac{A_{650} \times 204000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{A_{280} \times 230000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} = 0,887 A_{650} / A_{280} \quad [\text{IX}]$$

Поскольку Су5 обладает небольшим поглощением в УФ области (коэффициент молярного поглощения равен $9200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ на 280 нм), при использовании значительных избытков метки приходится в формуле [IX] учитывать собственное поглощение Су5 на 280 нм:

$$\eta = \frac{A_{650} \times 204000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{230000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times (A_{280} - \frac{9200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{230000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times A_{650})} = 0,887 A_{650} / (A_{280} - 0,04 \times A_{650}) \quad [\text{X}]$$

Мы поставили серию экспериментов, обрабатывая 200 мкг иммуноглобулина G человека реагентом **31** в различных соотношениях: 1:1, 1:2, :1:5, 1:10, 1:25 и 1:50. После выделения конъюгатов, мы оценивали степень протекания мечения по спектрам поглощения в УФ-видимой области (**рис. 2.26**). Для спектрофотометрического анализа больше подходит PBS, поскольку не обладает поглощением в ультрафиолетовой области, накладывающимся на максимум поглощения иммуноглобулинов (280 нм). Однако при больших избытках активированного эфира **31** он с трудом растворяет конъюгаты и для полноты растворения приходится использовать Трис-боратный буфер. Как видно на **рис. 2.27**, эффективность модификации уменьшается при использовании больших избытков реагента Су5 **31**, очевидно это связано с конечным количеством доступных аминогрупп на поверхности белковой глобулы.

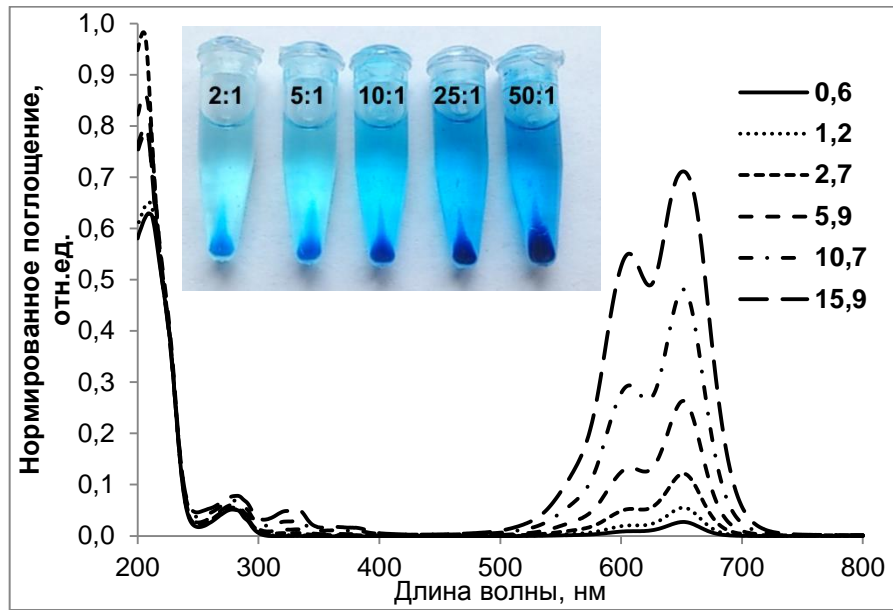


Рис. 2.26 Спектры поглощения антитела, меченного активированным эфиром Cy5 **31**. Наложенная фотография осажденных конъюгатов антитела при обработке сульфо-Cy5 азид/NHS эфиром **31**.

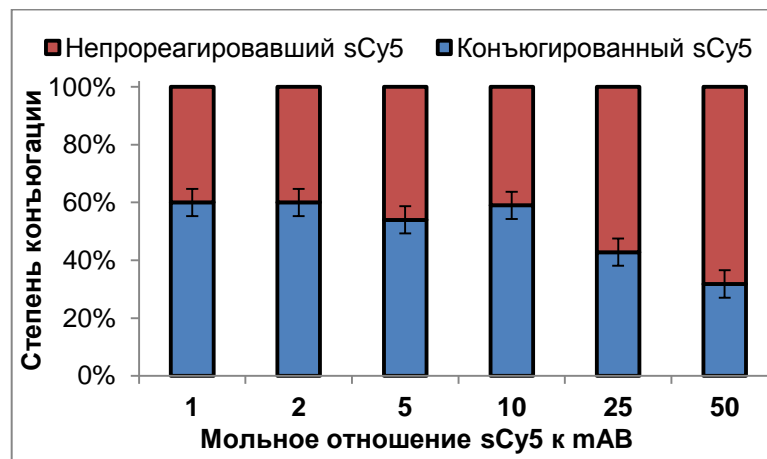


Рис. 2.27 Степень модификации моноклонального антитела при обработке активированным эфиром **31** в разных молярных отношениях. Оценена по формуле [X].

При введении одного фрагмента сульфо-Cy5 иммуноглобулин приобретает два отрицательных заряда, что сказывается на изоэлектрической точке белка. При этом размер и масса белка меняются незначительно. Обрабатывая антитело несколькими эквивалентами активированного эфира **31**, мы анализировали меченные Cy5 антитела при помощи высокоэффективной ионообменной хроматографии на колонке TSK gel DEAE-5PW (7,5×75 мм), элюируя градиентом ацетата натрия в Трис-боратном буфере[329]. ВЭЖХ профили нативного антитела и его конъюгаты наложены и приведены на **рис. 2.28**.

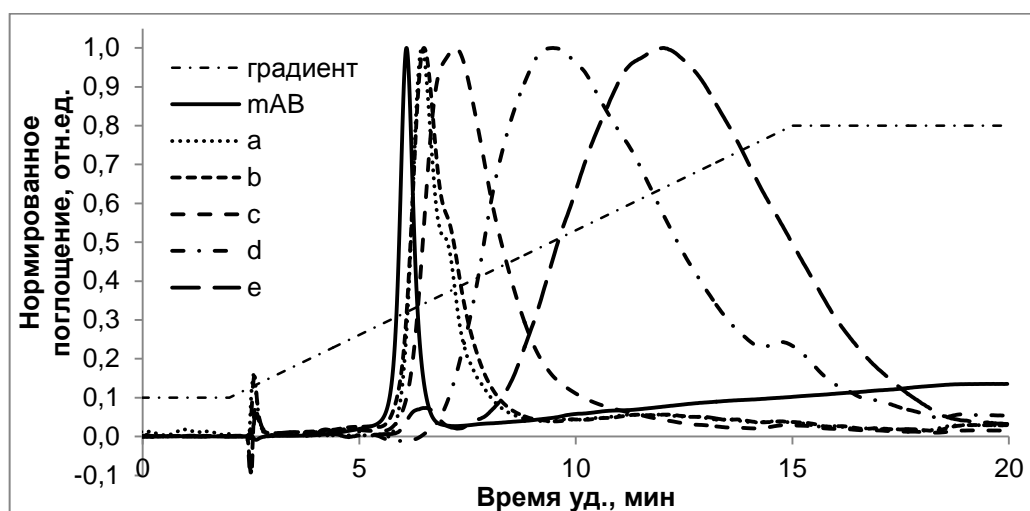


Рис. 2.28 Хроматограммы нативного и меченого моноклонального антитела, содержащего разное количество метки Cy5 **31** а) 0,6 экв. **31**, б) 1,2 экв. **31**, в) 2,7 экв. **31**, д) 5,9 экв. **31**, е) 10,7 экв. **31**. Раствор А: 20 мМ Трис-боратный буфер, рН 8,5, раствор Б: 2,0 М ацетат натрия в 20 мМ Трис-боратном буфере, рН 8,5. Градиент 0-2 мин 90% А/10% Б → 2-15 мин от 10% до 80% Б, → 80% Б/20% А.

2.3.3. Конъюгация меченых антител с олигонуклеотидами

Проведя мечение иммуноглобулинов и оценив степень их модификации, мы перешли непосредственно к конъюгации с олигонуклеотидом. Мы выбрали короткий синтетический олигонуклеотид (dT)₂₀ с введенной по 5'-положению аминогруппой и 3'-концевым алкином, планируя поэтапно ввести флуоресцентный маркер сульфо-Cy3 в 3'-положение через азидопроизводное в ходе Cu(I)AAC, а затем ацилировать 5'-аминогруппу NHS эфиром ADIBO **28** (рис. 2.29). «Клик»-реакцию с сульфо-Cy3 проводили в смеси вода/ДМСО 1:1 (v/v) по стандартному протоколу и очищали обращенно-фазовой хроматографией. Затем проводили ацилирование 5'-аминогруппы ADIBO NHS **28** в ТЕАА буфере с рН 8,25, продукт осаждали перхлоратом лития в ацетоне и без дополнительной очистки вводили в реакцию с модифицированным иммуноглобулином (рис. 2.30).

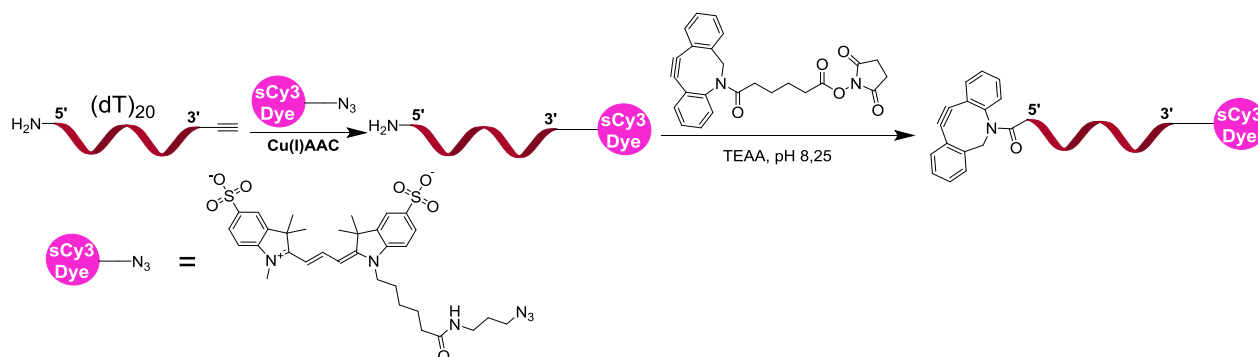


Рис. 2.29 Схема модификации модельного олигонуклеотида (dT)₂₀ сульфо-Cy3 и ADIBO NHS.

Реакция между азидогруппой и циклооктином (SPAAC) протекает избирательно и быстро, не требуя катализатора и инертной атмосферы. После осаждения олигонуклеотид немедленно использовали для конъюгации. К сожалению, нами было замечено, что ADIBO или другие циклооктины в составе олигонуклеотидов теряют свою активность при хранении. Вероятно это связано с присоединением воды по тройной связи ADIBO, возможно эту проблему можно решить лиофилизацией олигонуклеотидов с удалением следовых количеств влаги. Для полноты протекания SPAAC реакции между олигонуклеотидом и белком мы использовали 5-ти кратный мольный избыток модифицированного олигонуклеотида по отношению к азидогруппе в составе меченого антитела. Конъюгацию проводили при +37°C в Трис-боратном буфере в течение нескольких часов. Реакционную смесь осаждали 4М водным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, олигонуклеотид при этом оставался в растворе, а конъюгат антитела осаждался.

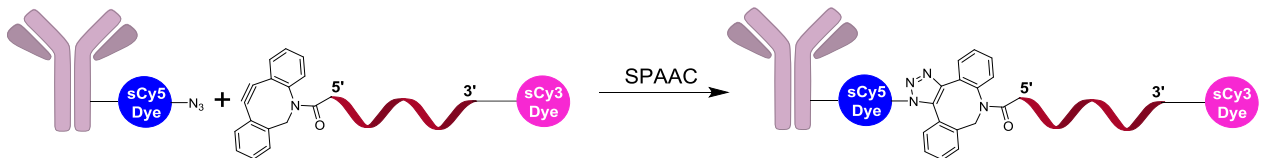


Рис. 2.30 Схема конъюгации иммуноглобулина с олигонуклеотидом при помощи кросс-линкеров 28 и 31.

Наличие двух цианиновых красителей в составе конъюгата позволяет оценить степень протекания реакции между антителом и олигонуклеотидом по соотношению интенсивностей их максимумов в спектрах поглощения. Ранее получение конъюгата ДНК с антителами подтверждали по положению максимума в спектре поглощения в УФ области. Поскольку максимумы поглощения иммуноглобулинов и олигонуклеотидов находятся на 280 нм и 260 нм, соответственно, по положению максимума конъюгата можно условно судить о стехиометрии, что конечно является неточным. Мы также наблюдали смещение максимума поглощения конъюгированного иммуноглобулина на 270 нм, а его спектр соответствует сумме двух спектров: меченого Cy5 антитела и олигонуклеотида с Cy3 до конъюгации (**рис. 2.31**).

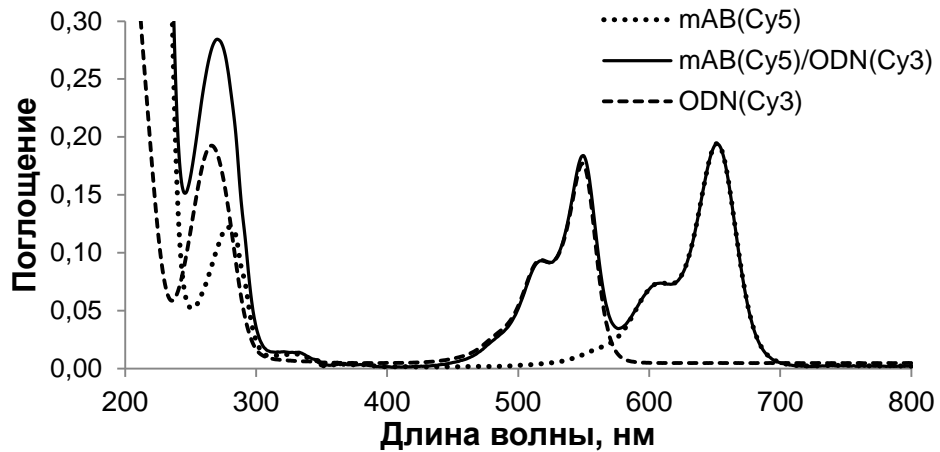


Рис. 2.31 Спектры поглощения олигонуклеотида с сульфо-Cy3, иммуноглобулина, меченного Cy5 **31**, их ковалентного конъюгата.

Кроме того, Cy3/Cy5 - это удачная FRET пара, которая неоднократно применялась для изучения конъюгации биомолекул. Способность к резонансному переносу энергии было использовано для подтверждения ковалентной природы конъюгата, а не неспецифического связывания биомолекул, обусловленного зарядовыми и прочими возможными взаимодействиями. Одноцепочечный олигонуклеотид, длиной в 20 нуклеотидов, позволяет переносить часть энергии возбуждения от Cy3 на Cy5, т.о. в спектре испускания такой системы мы должны наблюдать 2 полосы испускания обоих красителей при возбуждении Cy3 (рис. 2.32). Действительно, при возбуждении флуоресценции на длине волны 605 нм, мы регистрировали спектр Cy5, а при 520 нм - две полосы Cy3 и Cy5, при том, что сам Cy5 не возбуждается на этой длине волны.

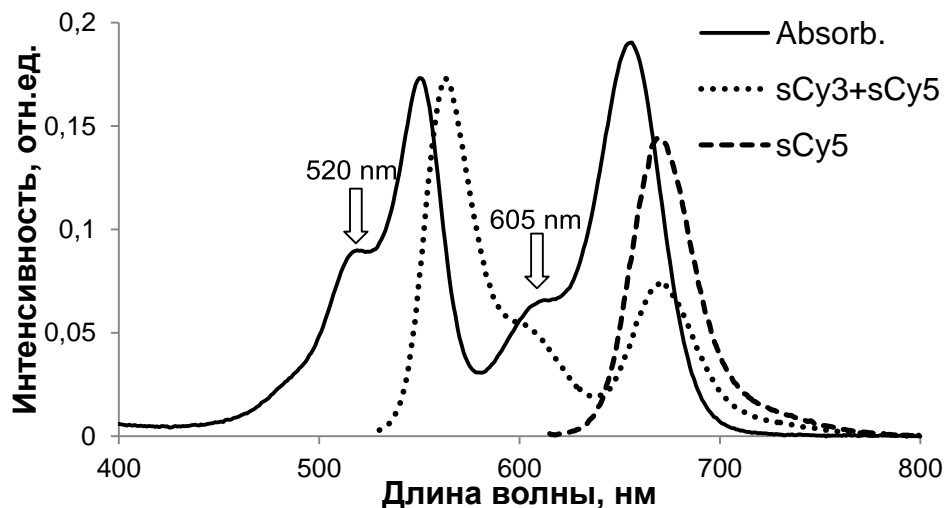


Рис. 2.32 Спектры поглощения и флуоресценции Cy3 и Cy5 в составе конъюгата олигонуклеотида с иммуноглобулином.

Эта тенденция сохраняется также при разном соотношении олигонуклеотидного фрагмента и иммуноглобулина (рис. 2.34). Так, нами была проведена серия

экспериментов по сочетанию 3'-Су3-олигонуклеотидов с антителами содержащими различное количество остатков азида **31** (рис. 2.30). К сожалению, реакция протекала количественно только на антителах с небольшой степенью модификации, так, не удавалось ввести более трех остатков олигонуклеотидов к иммуноглобулину, даже если количество азидогрупп на одну молекулу белка составляло более 10. Это может быть связано в первую очередь со стерическими затруднениями, а также изменением общего заряда конъюгата. Тем не менее, денатурации белка и выпадения осадка не наблюдалось ни в одной из реакций. На рис. 2.33 приведены спектры поглощения выделенных конъюгатов с одинаковой концентрацией иммуноглобулинового фрагмента в растворах. Видно, что количество введенных олигонуклеотидов возрастает не пропорционально введенным азидогруппам при высоких степенях модификации.

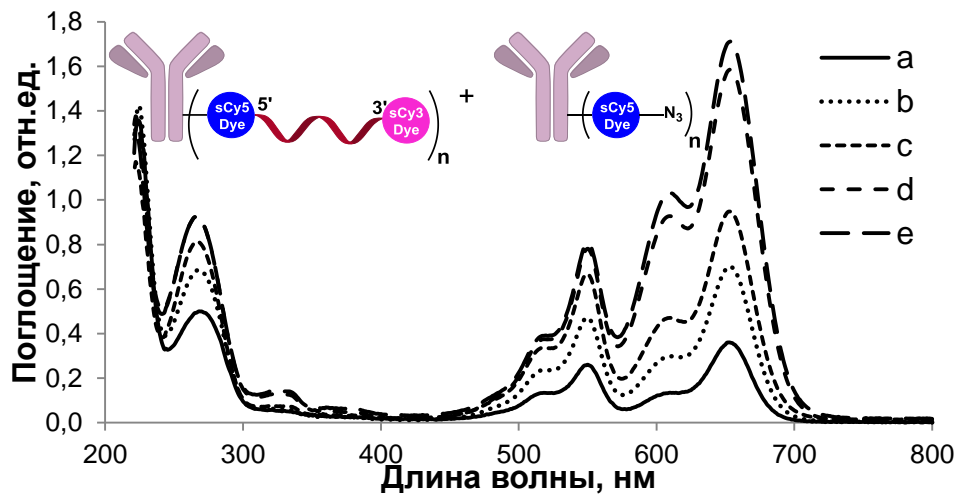


Рис. 2.33 Спектры поглощения выделенных конъюгатов иммуноглобулина с олигонуклеотидами. Кривые соответствуют конъюгатам а, b, c, d, e, содержащим 0.6, 1.2, 2.7, 5.9 и 10.7 азидогрупп на молекулу антитела соответственно.

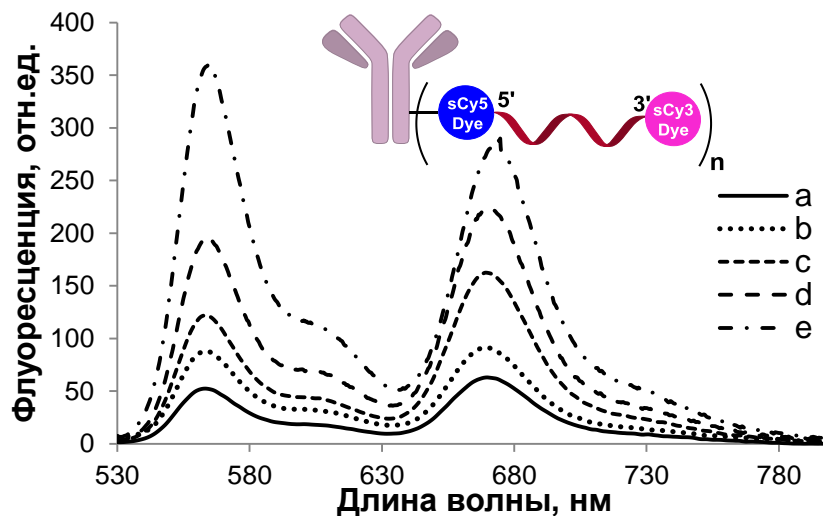


Рис. 2.34 Спектры флуоресценции конъюгатов иммуноглобулинов и олигонуклеотида d(T)₂₀, меченные Су3 и Су5 на длине волны возбуждения 520 нм: а) n = 0.6 экв, б) n = 1.2 экв, в) n = 2.7 экв, д) n = 5.9 экв, е) n = 10.7 экв.

Конъюгаты b и c, содержащие около одного и двух остатков олигонуклеотидов, соответственно были охарактеризованы при помощи гель-проникающей хроматографии на колонке TSK gel 4000 (26×8 мм). ВЭЖХ профили конъюгатов носят дискретный характер, при этом время удерживания снижается в сравнении с нативным антителом (рис. 2.35).

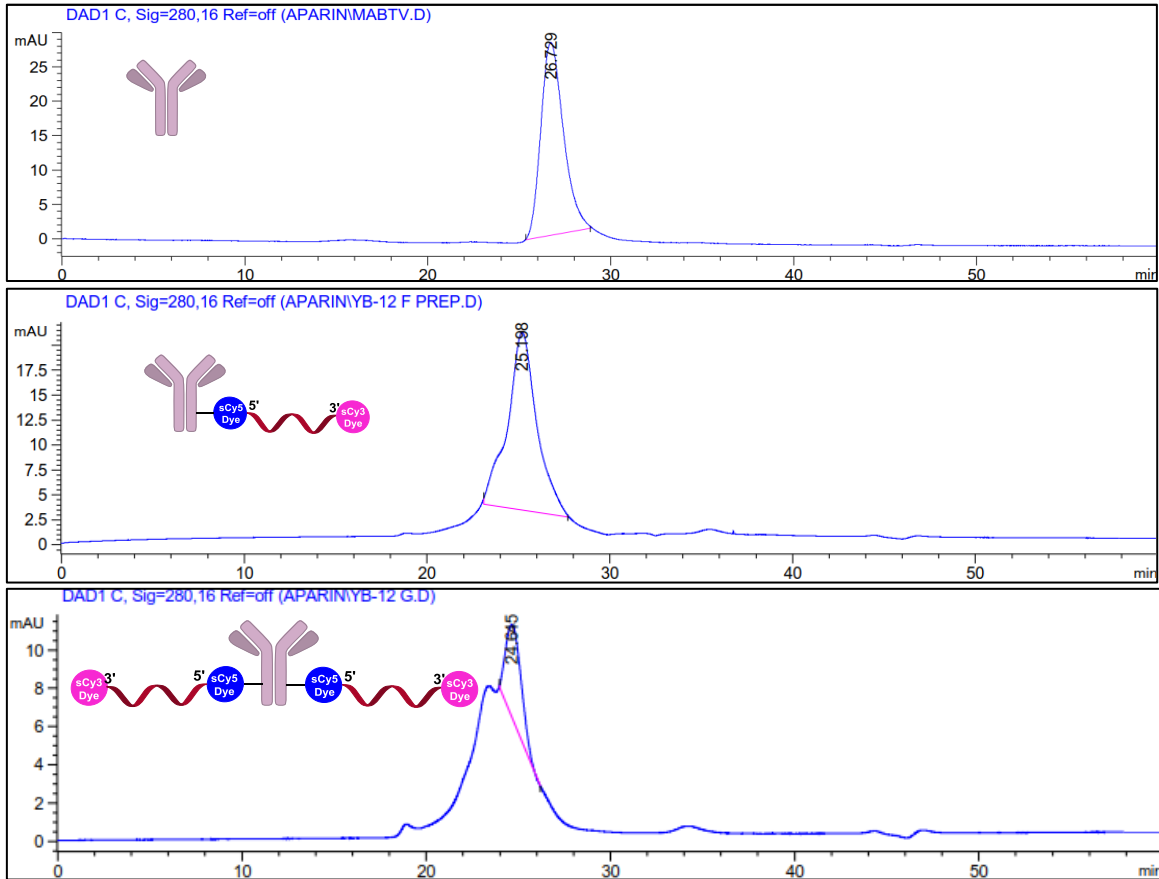


Рис. 2.35 Гель-проникающие хроматограммы а) нативного антитела, б) конъюгата с одним остатком олигонуклеотида, в) конъюгата с двумя остатками олигонуклеотида.

Таким образом, была отработана методика контролируемого введения азидогрупп в молекулу иммуноглобулина. Оценка стехиометрии меченого антитела легко проводить спектрофотометрически. Также на модельной системе отработаны условия ковалентного присоединения последовательности олигонуклеотида к белковой глобуле в мягких условиях, не приводящих к ее денатурации.

ГЛАВА 3. Экспериментальная часть

Растворители

Все органические растворители квалификации «х.ч.» и «ос.ч.» (Химмед, Merck, Aldrich, Fisher, ABCR) перегоняли перед использованием. ТГФ, диэтиловый эфир абсолютизировали перегонкой над свежеприготовленным кетилем бензофенона с натрием в атмосфере аргона, непосредственно перед использованием. ДХМ для синтеза фосфамидитов перегоняли над CaH_2 перед использованием. Осушенный ацетон для осаждения цианиновых красителей выдерживали сутки над безводным CaCl_2 , декантировали и перегоняли. Бензол для лиофилизации фосфамидитов кипятили над металлическим натрием и перегоняли в инертной атмосфере. ДМФА, ДМСО осушали над CaH_2 в течение суток и перегоняли в вакууме мембранного насоса, хранили над молекулярными ситами 4 Å. Пиридин перегоняли над CaH_2 и хранили над молекулярными ситами 4 Å. Толуол, этанол (96%), метанол, этилацетат, гексан, хлороформ, ацетон перегоняли при атмосферном давлении, отбрасывая предгон и кубовый остаток. Уксусную кислоту и пропионовый ангидрид использовали без дополнительной очистки.

Дейтерированные растворители ДМСО- d_6 (ABCR) хранили над молекулярными ситами 3 Å, ацетонитрил- d_3 (ABCR) ампулах в запаяных и вскрывали перед использованием, CDCl_3 (ABCR) хранили при +4°C над серебряной проволокой. Ацетонитрил для ВЭЖХ (ABCR) использовали без дополнительной очистки.

Реактивы

Триэтиламин, DIPEA, DIEA перегоняли над CaH_2 и хранили над молекулярными ситами 4 Å. Пентафторфенол, ДЦК, PyBOP, TSTU, *t*BuOK, Br_2 , SOCl_2 , LiAlH_4 , NaN_3 , гидрохлорид гидроксилamina, дибензосуберенон, BMS, 4,4'-диметокситритилхлорид (DmtCl), холестерилхлороформиат (Sigma Aldrich или Across Organics) использовали без дополнительной очистки.

Пентафторфениловые эфиры пирен-1-карбоновой кислоты[330], кумарина 343[331], биотина[332] были получены по описанным методикам с использованием пентафторфенола и ДЦК, хранились в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . О-Дипивалоилкарбоксивфлуоресцеины 5-FAM и 6-FAM синтезировали по описанной методике в две стадии, разделение региоизомеров проводили также как описано[313]. 1-Этинилпирен синтезировали из пирена в три стадии[333]. 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **20** получали из триэтиленгликоля в две стадии[334], 3-азидо-1-аминопропан - из гидробромида 1-амино-3-бромпропана[335]. Гидрохлорид

дианилида малондиальдегида[336] и 1-(5-карбокспентил)-5-сульфо-2,3,3-триметилиндолинин[337] для синтеза цианинового красителя Cy5 **29** синтезировали как описано. Предшественники для синтеза ADIBO NHS реагента, 5,6-дигидродибензоазоцин[338] и хлорангидрид полуэфира адипиновой кислоты[339] получали в соответствии с литературными методиками.

Реагенты для олигонуклеотидного синтеза: защищенные 2'-дезоксирибонуклеозиды, 3'-фосфамидиты, универсальный пористый носитель Unylinker-CPG (500 Å), LCAA CPG (500 Å) S-этилтио-1H-тетразол (ChemGenes), Dabcyl CPG, 5'-алкиновый и 5'-аминогексанольный амидиты (Lumiprobe LLC). Модифицированный носитель на основе пористого стекла для твердофазного синтеза **7в** получали конденсацией соединения **6в** с аминогруппами на поверхности стекла при помощи PyBOP в абс. ДМФА как описано в [340]. Концентрацию мономерного блока оценивали спектрофотометрически смывая Dmt^+ -катион с навески модифицированного стекла трифторуксусной кислотой в ДХМ и оценивая поглощение на 504 нм. Концентрация **7в** на пористом носителе оказалась 55 мМоль на 1 г пористого стекла.

Растворы кросс-сшивающих реагентов **28** и **31** готовили в свежеперегнанном сухом ДМСО с концентрацией 10 мМ. Для соединения **31** концентрацию стокового раствора оценивали дополнительно спектрофотометрически, по поглощению цианинового красителя сульфо-Cy5. Приготовленные растворы хранили при -20°C в течение месяца и отогревали до комнатной температуры перед использованием. Для конъюгации использовали иммуноглобулин G человека, наработанный и любезно предоставленный сотрудником ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Татьяной Николаевной Власик.

Катионит Dowex-50WX в H^+ -форме (BioRad) выдерживали 1 ч на УЗ-бане в дистиллированной воде, после набухания воду декантировали, а смолу промывали большими количествами воды.

Материалы и методы

Температуры плавления низкомолекулярных соединений определяли на нагревательном столике Voetius с чувствительным термометром под микроскопом (не исправлены). Кристаллы образца помещали на столике между двух покровных стекол.

ЯМР спектры на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P регистрировались на спектрометрах Bruker DRX-500 или Bruker Advance 500 на частотах 500,0 МГц для ^1H , 125,7 МГц для ^{13}C , 470,4 МГц для ^{19}F , 202,4 МГц для ^{31}P ядер, соответственно. Спектры откалиброваны по остаточным сигналам протонов растворителя: ДМСО- d_6 (2,50 м.д. для ^1H и 39,5 м.д. для

^{13}C), CDCl_3 (7,25 м.д. для ^1H и 77,0 м.д. для ^{13}C), ацетопитрил- d_3 (1,94 м.д. для ^1H и 1,32 м.д. для ^{13}C). Химические сдвиги приведены относительно тетраметилсилана (^1H и ^{13}C).

ВЭЖХ анализа низкомолекулярных соединений проводили на хроматографе Agilent 1100 с мультиволновым детектором на основе диодной матрицы на обращенно-фазовой колонке Symmetry C8 или C18, Waters. Температура колонки 30°C, скорость потока 1 мл/мин.

Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II методом ионизации электрораспылением (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 V) или отрицательных (напряжение на капилляре 3200 V) ионах. Диапазон сканирования масс — m/z 50 — 3000, калибровка — внешняя или внутренняя (ESI Tuning Mix, Agilent). Использовался шприцевой ввод вещества для растворов в ацетонитриле, метаноле или воде, скорость потока — 3 мкл/мин. Газ-распылитель — азот (4 л/мин), температура интерфейса — 180°C.

Олигонуклеотидный синтез проводили в ABI 3400(3900) ДНК синтезаторе фосфамидитным методом в соответствии с протоколами поставщика. Время конденсации фосфамидитов полученных на основе пантолактона увеличили до 360 сек. Для 3'-немодифицированных олигонуклеотидов использовали универсальный носитель Unylinker-CPG (500 Å), 3'-алкиновые олигонуклеотиды синтезировали на носителе с *N*-гексиноил-L-пролинолом, тушители флуоресценции ВНQ1 и ВНQ2 вводились в 3'-терминальную часть олигонуклеотидов с помощью модифицированных носителей. 5'-Алкин, 5'-аминогруппу и флуоресцентные красители вводили конденсацией соответствующих фосфамидитов. Деблокирование олигонуклеотидов с носителя проводили смесью 40% водного метиламина и концентрированного аммиака в объемном отношении 1:1 в течение 3 ч при комнатной температуре.

Постмодификация олигонуклеотидов.

Cu(I)AAC.

После деблокирования с твердого носителя олигонуклеотиды с терминальной тройной связью или аминогруппой подвергались постсинтетическому мечению. 5'-Алкиновые олигонуклеотиды конъюгировали «клик»-реакцией: алкиновый олигонуклеотид (2 нмоль) растворяли в 1М ТЕАА (30 мкл), затем последовательно добавляли медный катализатор в 60% водном ДМСО (15 мМ ТВТА и 13 мМ сульфат меди), 10 мкМ азидопроизводного в ДМСО (4мкл) и 80% водном ДМСО (140 мкл). Раствор дегазировали и продували аргоном. Затем, вносили раствор 0,25 М аскорбиновой кислоты (6 мкл). Реакционную смесь выдерживали в течение ночи при комнатной температуре в защищенном от света месте и через 12 ч осаждали раствором 4%

перхлората лития в ацетоне. Для полноты осаждения после добавления ацетона смесь выдерживали при -20°C в течение 20 мин.

Твердофазный вариант «клик»-реакции проводили в лунках планшета, не удаляя олигонуклеотид с пористого стекла. Добавляли 4×100 мкл раствор содержащий 10 мМ соответствующего азиды (2 экв) в соответствующем растворителе, катализатор 100 мМ $\text{CuI} \times \text{P}(\text{OEt})_3$, инкубировали 4 ч и промывали чистым растворителем. Олигонуклеотид деблокировали раствором 1,2-этилендиамина в толуоле 1:1 v/v в течение 2 ч при комнатной температуре, стекло промывали ацетонитрилом (4×150 мкл), олигонуклеотид элюировали 50% водным ацетонитрилом 1:1 v/v. Или в качестве альтернативы использовали смесь АМА (концентрированный водный аммиак и 40% метиламин 1:1 v/v) в течение 30 мин при 65°C .

Ацилирование аминокильных олигонуклеотидов.

Олигонуклеотид с аминогруппой (10 нмоль) растворяли в 0,2 М ТЕАА буфере (pH 8.25) (100 мкл) и добавляли NHS-активированный эфир (50-300 нмоль) в ДМСО (100 мкл). Реакционную смесь перемешивали и оставляли на 2-4 ч при комнатной температуре. Контроль за протеканием реакции проводили методом ВЭЖХ, при неполном протекании реакции к реакционной смеси добавляли такое же количество активированного эфира в ДМСО (50 мкл) и 0.2М ТЕАА буфер (50 мкл) и оставляли на ночь. Осаждение олигонуклеотида проводили аналогично $\text{Cu}(\text{I})\text{AAC}$.

Осажденные олигонуклеотиды после пост-мечения растворяли в натрий-фосфатном буфере и очищали хроматографически как описано ниже. Фракции, содержащие чистый продукт, осаждали раствором 4% перхлората лития в ацетоне. Осадок растворяли в дистиллированной воде и обессоливали на ионообменных колонках NAP-5 или NAP-10, уравновешенных в дист воде. Элюировали дист. водой в соответствии со стандартными рекомендациями поставщика. Обессоленный олигонуклеотид хранили при -20°C в растворе и размораживали перед использованием или упаривали досуха в вакуумной центрифуге Concentrator plus (Eppendorf).

Очистку олигонуклеотидов проводили дважды денатурирующим ПААГ затем обращенно-фазовой хроматографией. Денатурирующий электрофорез в геле проводили в 15% ПААГ в 7 М мочеvine в Трис-боратном буфере (50 мМ Трис \times НCl, 50 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА, pH 8.3). Олигонуклеотиды выделяли из геля электроэлюированием Elutrap (Whatman) в Трис-боратном буфере (5 мМ Трис \times НCl, 5 мМ борной кислоты, pH 8.3). ВЭЖХ очистку олигонуклеотидов проводили на C18 колонке: Jupiter, $4,6 \times 250$ мм (5 мкм, Phenomenex). Буфер А: 0,05 М ацетат аммония pH 7.0, 5% MeCN, буфер Б: 0,03 М ацетат аммония, 80% MeCN, pH 7.0; элюировали градиентом буфера В: $0 \rightarrow 15\%$ (1 объем

колонки), 15→50% (10 объемов колонки); скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 45°C.

Чистоту олигонуклеотидов анализировали ВЭЖХ на обращенной фазе C18, колонка: Jupiter, 4,6×250 мм (5 мкм, Phenomenex). Буфер А: 0,05 М ацетат аммония pH 7.0, 5% MeCN, буфер Б: 0,03 М ацетат аммония, 80% MeCN, pH 7.0; элюировали линейным градиентом буфера В: 0→100% (8 объемов колонки). Во всех случаях скорость потока составляла 1 мл/мин; колонка термостатировалась при 45°C. Масс-спектры получали ионизацией электроспреем на масс-спектрометре Bruker Maxis Impact q-TOF как описано в [341].

Кривые температурной денатурации олигонуклеотидных дуплексов и шпилечных зондов проводили в образцах, объемом 25 мкл, содержащих 5 мкл PCR-mix-2-FRT (AmpliSens, Россия), 176 мкл dNTPs (Biosan, Россия) и 1,2 мкМ флуоресцентного олигонуклеотида. Плавление проводили в амплификаторе RotorGene 6000 (Corbett Research) при следующих условиях: нагревание от 30°C до 80°C с шагом 2°C в мин, охлаждение от 80°C до 30°C с шагом в 2°C в мин. Флуоресцентный сигнал регистрировали каждые 30 с в “голубом” или “зеленом” канале амплификатора.

ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных ДНК-зондов проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси. Образцы содержали 5 мкл смеси PCR-mix-2-FRT (AmpliSens, Россия), 2,5 U TaqF полимеразы (AmpliSens, Россия) и 176 мкМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (Biosan, Россия). Конечная концентрация праймеров и флуоресцентных зондов составляла 0,36 мкМ и 0,12 мкМ. Для проведения реакции использовали амплификатор RotorGene 6000 (Corbett Research), условия термостатирования: 0 цикл при 95°C/15 мин, затем 45 циклов при 95°C/10 с, 55°C/25 с и 72°C/10 с. Флуоресцентный сигнал регистрировали при 55°C в каждом из 45 циклов. Пороговое значение флуоресценции выставляли вручную для логарифмической кривой. Дизайн праймеров и TaqMan зондов проводили при помощи ПО Sarani (Strand Genomics, США).

Спектры поглощения в УФ-видимой области регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 в кварцевых в кюветах длиной 10 мм, в диапазоне от 200 до 800 нм. Количество олигонуклеотидов определяли в оптических единицах (о.е.) на длине волны 260 нм, исходя из поглощения и коэффициентов молярного поглощения. Количество моноклональных антител определяли по оптическому поглощению на длине волны 280 нм, учитывая средний молярный коэффициент поглощения иммуноглобулинов 204000 М⁻¹×см⁻¹. Измерения поглощения биомолекул проводили в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.4, поглощение олигонуклеотидов также измеряли в дистиллированной воде.

Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов. были определены при помощи программы находящейся в открытом доступе на сайте: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. Для модифицированных олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов учитывали вклад красителей в суммарные коэффициенты поглощения, руководствуясь значениями приведенными на сайте <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> для стандартных модификаций. Для синтезированных азидопроизводных и фосфамидитов молярные коэффициенты поглощения рассчитывали по спектру поглощения растворов в 96% этаноле, приготовленных из навесок с точно определенной массой.

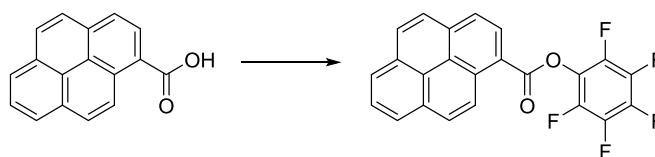
Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре PerkinElmer LS 55 при комнатной температуре, если не указано другой. Размеры входной и выходной щелей 10 нм. Спектры олигонуклеотидных зондов регистрировали в гибридизационном буфере. Флуоресцентные красители измеряли в 96% этаноле, если не указано другое. Квантовые выходы флуоресценции определяли относительным методом с использованием стандартов для квантового выхода (9,10-DPA для полиароматических флуорофоров,[342] сульфо-Су5 и сульфо-Су3 карбоновые кислоты в PBS pH 7.4 для цианиновых красителей[301]). Для расчетов пользовались формулой: $\Phi_{f_x} = \Phi_{f_{ct}} \times [A_{ct}/A_x] \times [I_x/I_{ct}] \times [\eta_x/\eta_{ct}]^2$.

Кинетические кривые затухания флуоресценции детектировали на флуориметре Fluorolog-3 (Horiba JY) на максимуме эксимерной флуоресценции для каждой из четырех пиреновой пары, длина волны возбуждающего излучения - 344 нм. Время жизни флуоресценции определяли при помощи монофотонного датчика флуориметра (размер входной и выходной щелей 7 нм). Спектры испускания и возбуждения эксимерных флуорофоров и сульфо-Су3, показанные на **рис. 2.11**, измеряли на том же приборе. Спектры возбуждения записывали при регистрации флуоресценции на максимуме испускания Су3 или пиренового эксимера.

Проведение органического синтеза.

Для проведения реакций в безводных условиях реактор предварительно прокаливали в пламени и охлаждали в токе аргона. Реакцию предохраняли от следов влаги при помощи осушающей трубки с хлористым кальцием. Реакции, проводимые в инертных условиях, замораживали в жидком азоте, дегазировали в вакууме масляного насоса в течение 20 мин и продували аргоном. На протяжении реакции, поддерживали небольшое избыточное давление аргона. За протеканием реакций следили при помощи ТСХ на алюминиевых пластинах с нанесенным слоем силикагеля Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) с люминофором. Ароматические соединения визуализировали под УФ-лампой на 254 нм и

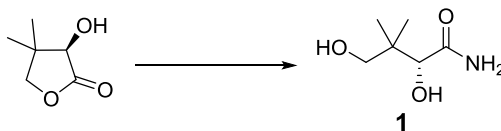
365 нм; производные биотина и алкены проявляли смесью KMnO_4 в разбавленной уксусной кислоте, соединения с аминогруппой проявляли нингидрином в этаноле, алифатические соединения, в т.ч. - производные холестерина, обрабатывали раствором $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6/\text{Na}_2\text{MoO}_4/\text{H}^+$ с образованием молибденовой сини на местах пятен, 4,4'-диметокситриглицерольные производные проявляли парами трифторуксусной кислоты. Разделение смесей низкомолекулярных соединений проводили колоночной хроматографией на силикагеле Kieselgel 60 (Merck) размер частиц 0,040–0,063 мм, предварительно набухшем в элюенте. Органические экстракты после промывок водой сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали, растворители удаляли полностью (если не указано другое) в вакууме мембранного насоса на роторном испарителе. Остатки растворителей удаляли в вакууме масляного насоса (0,1–0,5 мм. рт. ст.) до постоянной массы вещества с точностью до третьей значащей цифры. Вещества, если это необходимо, сушили от следов влаги в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Нанесение смеси проводили в минимальном объеме элюента. Собранные фракции анализировали с помощью тонкослойной хроматографии.



Пентафторфениловый эфир пиренкарбоновой кислоты

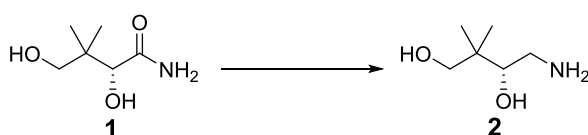
Пирен-1-карбоновую кислоту (2,12 г, 8,6 ммоль) суспендировали в сухом ДХМ (100 мл) и прибавили пентафторфенол (1,75 г, 9,5 ммоль). Смесью охладили на бане со льдом и добавили раствор дициклогексилкарбодиимида (1,86 г, 9,0 ммоль) в ДХМ (20 мл). Смесью выдержали ночь при перемешивании. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровали и промыли небольшим количеством охлажденного ДХМ. Маточный раствор сконцентрировали в вакууме, остаток растворили в этилацетате (200 мл), промыли водой (100 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×150 мл), рассолом NaCl (50 мл), сушили Na_2SO_4 и упарили досуха. Продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюент ДХМ/этилацетат = 98:2. Выход: 3,30 г (93%) желтые кристаллы. R_f 0,74 (ДХМ/н-гексан = 1:1). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ): 9,20 (д, $J = 9,5$ Гц, 1H, пирен), 8,85 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H, пирен), 8,28–8,16 (м, 5H, пирен), 8,09–8,05 (м, 2H, пирен); ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , δ): 163,19 (C=O), 135,70 (пирен), 132,47 (пирен), 130,81 (пирен), 130,72 (пирен), 130,57 (пирен), 130,12 (пирен), 129,32 (пирен), 127,03 (пирен), 127,00 (пирен), 126,92 (пирен), 126,62 (пирен), 124,69 (пирен), 124,13 (2C, пирен), 123,74 (пирен),

118,83 (пирен); ^{19}F -ЯМР (CDCl_3 , δ): -152,23 (м, 2F), -158,05 (т, $J = 21,7$ Гц, 1F), -162,31 (м, 2F). МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_9\text{F}_5\text{NaO}_2$, 435,0415; найдено, 435,0422.



(R)-2,4-Дигидрокси-3,3-диметилбутанамид (1)

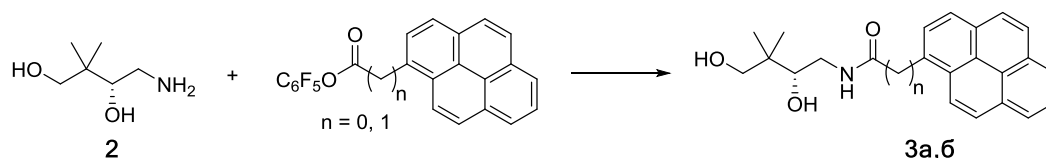
D-(-)-пантолактон (32,5 г, 0,25 моль) растворили в метаноле (200 мл) в 0,5 л круглодонной колбе с магнитным якорем. Раствор заморозили в жидком азоте и дегазировали, затем к колбе подсоединили камеру с газообразным аммиаком (~5 л). После отогревания раствора до комнатной температуры смесь стали перемешивать, при этом раствор активно поглощает аммиак и разогревается. Метанольный раствор насытили аммиаком, наполняя камеру газом при уменьшении ее объема более чем наполовину. Реакционную смесь выдержали при перемешивании 36 ч, затем упарили в вакууме до образования вязкой бесцветной массы. Остаток перетирали с диэтиловым эфиром (100 мл) до полной кристаллизации, отфильтровали и промыли небольшими порциями диэтилового эфира. Выход: 36,3 г (99%) белые кристаллы, т.пл. 128–130°C. ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, δ): 7,12 (с, 2H), 5,23 (д, $J = 5,7$ Гц, 1H), 4,49 (дд, $J = 4,7, 4,5$ Гц, 1H), 3,66 (д, $J = 5,7$ Гц, 1H), 3,31 (дд, $J = 4,7$ Гц, 1H), 3,18 (дд, $J = 4,5$ Гц, 1H), 0,82 (с, 3H), 0,81 (с, 3H).



(R)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диол (2)

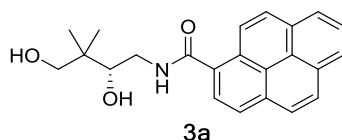
Трехгорлую круглодонную колбу объемом 1 л, снабженную магнитной мешалкой, обратным холодильником, термометром и капельной воронкой, продули аргоном и внесли в нее соединение **1** (29,4 г, 0,2 моль) в абс. ТГФ (600 мл) в противотоке аргона. Комплекс BMS (57,0 мл, 0,6 моль) поместили в капельную воронку через канюлю. Реакционную смесь охладил на ледяной бане. Комплекс борана добавляли по каплям к раствору амида при интенсивном перемешивании, поддерживая температуру смеси 0–5°C. После прибавления амида реактор продули аргоном и кипятили 8 ч в инертной атмосфере. Реакционную смесь охладил до комнатной температуры. Добавили воду (50 мл) по

каплям, затем предварительно набухший и промытый катионит Dowex-50WX в H⁺-форме в воде (1,7 ммоль/мл, 200 мл набухшей смолы). Выделяющийся диметилсульфид улавливали щелочным раствором 10% пероксида водорода в промывалке Дрекселя. Для разложения комплекса борана смесь нагрели до 50°C и перемешивали 30 мин при этой температуре. Охладив смесь до комнатной температуры, катионит отфильтровали, промыли водой (2 л) и 96% этанолом (800 мл). Продукт восстановления элюировали с катионной смолы смесью MeOH/Et₃N = 19:1 и концентрировали в вакууме. Полученный сиропобразный раствор экзотермически кристаллизуется при удалении остатков растворителя в вакууме при 40°C. Выход: 20,3 г (76%) белая кристаллическая масса, т. пл. 212–214°C (этанол 96%), $[\alpha]_D^{27} -23,0$ (с 1,0, 96% EtOH). ¹H-ЯМР (ацетонитрил-*d*₃, δ): 3,33 (д, *J* = 11,0 Гц, 1H, CH₂ОН), 3,28 (дд, *J* = 7,7, 3,6 Гц, 1H, СНОН), 3,22 (д, *J* = 11,0 Гц, 1H, CH₂ОН), 2,80 (дд, *J* = 12,5, 3,6 Гц, 1H, NHCH₂), 2,52 (дд, *J* = 12,5, 7,7 Гц, 1H, NHCH₂), 0,83 (с, 3H, CH₃), 0,82 (с, 3H, CH₃); ¹³C-ЯМР (DMCO-*d*₆, δ): 76,52 (СНОН), 67,80 (CH₂ОН), 42,56 (CH₂NH), 38,61 ((CH₃)₂C), 21,30 (CH₃), 20,64 (CH₃). МСВР (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ рассчитано для C₆H₁₆NO₂, 134,1176; найдено, 134,1152.



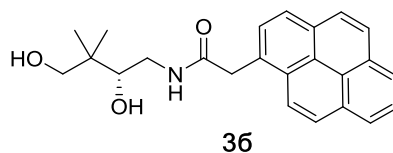
Общая методика I: ацилирование (*R*)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диола (**2**) пентафторфениловыми эфирами

(*R*)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диол **2** (880 мг, 6,6 ммоль) суспендировали в ДХМ (20 мл), затем добавили пентафторфениловый эфир (6 ммоль) и триэтиламин (830 мкл, 6,6 ммоль). Смесь перемешивали 2-3 ч до полноты конверсии активированного эфира. Все летучие компоненты удаляли в вакууме, сухой остаток перетирали с водой (50 мл). Осадок отфильтровали, промыли 5% карбонатом калия для удаления пентафторфенола, водой, просушили на воздухе и в вакуум-эксикаторе над P₂O₅. Продукт ацилирования выделяли с количественным выходом и использовали без дальнейшей очистки.



(R)-N-(2,4-дигидрокси-3,3-диметилбутил)пирен-1-карбоксамид (3а)

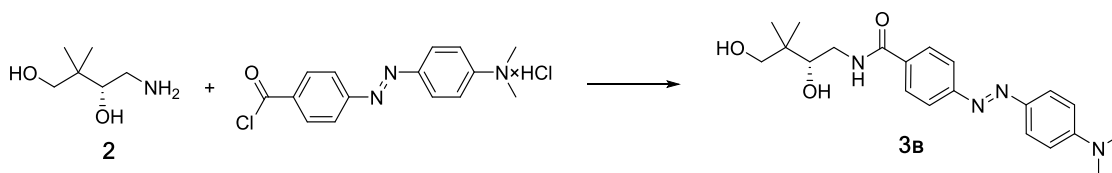
Соединение **3а** получили в соответствии с общей методикой **I** в виде бесцветного порошка, выход: 2,14 г (99%), R_f 0,45 (ДХМ/метанол = 95:5), т. пл. 183-185°C (толуол). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,59 (д, $J = 9,4$ Гц, 1H, H10, пирен), 8,52 (т, $J = 5,4$ Гц, 1H, NH), 8,33-8,31 (м, 3H, H3, H6, H8, пирен), 8,26-8,19 (м, 4H, H2, H4, H5, H9, пирен), 8,10 (т, $J = 7,6$ Гц, 1H, H7, пирен), 4,80 (д, $J = 4,1$ Гц, 1H, CHOH), 4,58 (м, 1H, CH_2OH), 3,80-3,71 (м, 1H, CHOH), 3,70 (м, 1H, CH_2NH), 3,40-3,22 (м, 3H, CH_2NH , CH_2OH), 0,94 (с, 3H, CH_3), 0,92 (с, 3H, CH_3); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 169,04 (C=O), 132,18 (C1, пирен), 131,51 (C3а, пирен), 130,70 (C5а, пирен), 130,20 (C8а, пирен), 128,18 (C5, пирен), 127,94 (C9, пирен), 127,82 (C10а, пирен), 127,18 (C4, пирен), 126,49 (C7, пирен), 125,69 (C6, пирен), 125,52 (C8, пирен), 125,32 (C2, пирен), 124,91 (C10, пирен), 124,35 (C3, пирен), 123,80 (C10b, пирен), 123,66 (C10с, пирен), 73,86 (CHOH), 68,15 (CH_2OH), 42,35 (CH_2NH), 38,81 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21,24 (CH_3), 19,97 (CH_3). МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{NO}_3$, 362,1751; найдено, 362,1758.



(R)-N-(2,4-дигидрокси-3,3-диметилбутил)-2-(пирен-1-ил)ацетамид (3б)

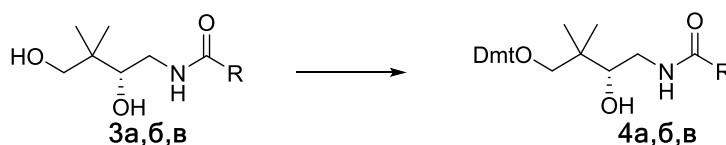
Соединение **3б** получили в соответствии с общей методикой **I** в виде желтого порошка, выход: 2,23 г (99%). R_f 0,41 (ДХМ/метанол = 95:5), т. пл. 182-184°C (толуол). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,41 (д, $J = 9,2$ Гц, 1H, H10, пирен), 8,29-8,20 (м, 4H, H3, H6, H8, H9, пирен), 8,15 (с, 2H, H4, H5, пирен), 8,10-8,02 (м, 3 H, NH, H2, H7, пирен), 4,60 (д, $J = 5,4$ Гц, 1H, CHOH), 4,45 (т, $J = 5,4$ Гц, 1H, CH_2OH), 4,23 (с, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 3,46-3,41 (м, 1H, CHOH), 3,35-3,38 (м, 1H, CH_2NH), 3,13-3,26 (м, 2H, CH_2OH), 2,82-2,88 (м, 1H, CH_2NH), 0,76 (с, 6H, $2 \times \text{CH}_3$); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 170,29 (C=O), 131,08 (C5а, пирен), 130,83 (C3а, пирен), 130,38 (C8а, пирен), 129,70 (C1, пирен), 129,02 (C10а, пирен), 128,69 (C2, пирен), 127,38 (C4, пирен), 127,19 (C9, пирен), 126,79 (C5, пирен), 126,14 (C7, пирен), 125,03 (C6, пирен), 124,88 (C8, пирен), 124,74 (C3, пирен), 124,16 (C10, пирен), 124,11 (C10b, пирен), 123,94 (C10с, пирен), 74,03 (CHOH), 68,12 (CH_2OH), 41,57 (CH_2NH), 40,08

(C(O)CH₂), 38,64 (C(CH₃)₂), 21,04 (CH₃), 19,84 (CH₃). МСВР (ESI) m/z: [M+H]⁺ рассчитано для C₂₄H₂₆NO₃, 376,1907; найдено, 376,1911.



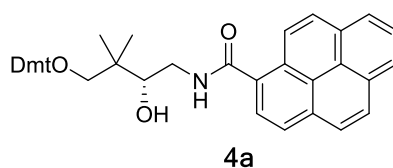
(*R,E*)-*N*-(2,4-дигидрокси-3,3-диметилбутил)-4-(4-диметиламинофенил)азобензамид (3в)

Триэтиламин (3,05 мл, 22 ммоль) прибавили по каплям к суспензии солянокислого хлорангидрида 4-диметиламиноазобензол-4'-карбоновой кислоты (3,24 г, 10 ммоль) в сухом ДХМ (100 мл), перемешивая при 0–5°C. Оранжевый раствор перенесли в капельную воронку и добавили по каплям к суспензии соединения **2** (1,46 г, 11 ммоль) в сухом ДХМ (100 мл). Смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре и сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в смеси этилацетата (200 мл) и воды (100 мл), органический слой промывали водой (2×100 мл), насыщенным раствором бикарбонатом натрия (2×50 мл), рассолом NaCl (50 мл), сушили сульфатом натрия и упарили досуха. Полученную смесь разделяли хроматографически на силикагеле, элюент ДХМ/MeOH от 95:5 до 90:10. Выход: 3,28 г (86%) красные кристаллы. *R_f* 0,31 (ДХМ/метанол = 95:5), т. пл. 194–196°C (толуол). ¹H-ЯМР (DMCO-*d*₆, δ): 8,39 (т, *J* = 5,3 Гц, 1H, NH), 8,01 (д, *J* = 8,5 Гц, 2H, Ar), 7,82 (м, 4H, Ar), 6,84 (д, *J* = 9,2 Гц, 2H, Ar), 4,70 (д, *J* = 5,0 Гц, 1H, CHOH), 4,47 (т, *J* = 5,3 Гц, 1H, CH₂OH), 3,60 (ддд, *J* = 13,4, 5,8, 2,2 Гц, 1H, CHOH), 3,54 (ддд, *J* = 9,0, 5,0, 2,3 Гц, 1H, CH₂NH), 3,26 (м, 2H, CH₂OH), 3,10 (м, 1H, CH₂NH), 3,07 (с, 6H, N(CH₃)₂), 0,86 (с, 3H, CCH₃), 0,85 (с, 3H, CCH₃); ¹³C-ЯМР (DMCO-*d*₆, δ): 165,83 (C=O), 153,89 (Ar), 152,79 (Ar), 142,64 (Ar), 134,97 (Ar), 128,35 (2C, Ar), 125,07 (2C, Ar), 121,47 (2C, Ar), 111,55 (2C, Ar), 73,69 (CHOH), 68,09 (CH₂OH), 42,28 (CH₂NH), 38,71 (C(CH₃)₂), 21,16 (CCH₃), 19,89 (CCH₃). МСВР (ESI) m/z: [M+H]⁺ рассчитано для C₂₁H₂₉N₄O₃, 385,2234; найдено, 385,2229.



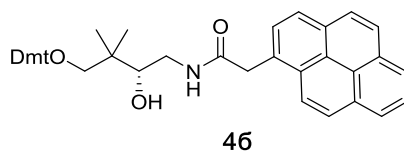
Общая методика II: введения диметокситритильной защиты

Соединение **3** (5 ммоль) упарили с абс. пиридином (2×20 мл), растворили в абс. пиридине 30 мл. Раствор охладили до 0°C и добавили одной порцией 4,4'-диметокситритилхлорид (1,86 г, 5,5 ммоль) в абс. пиридине (5 мл). Реакционную смесь оставили перемешиваться на ночь, затем разбавили этилацетатом (300 мл), промыли водой (3×300 мл), раствором 5% лимонной кислоты (2×150 мл), рассолом NaCl (50 мл), сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали смесью толуол/этилацетат/триэтиламин = 70:30:1. Чистый продукт упарили с ДХМ и вакуумировали на масляном насосе.



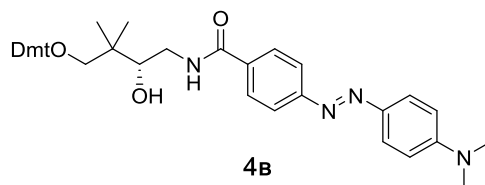
(R)-N-(2-Гидрокси-3,3-диметил-4-диметокситритилоксибутил)пирен-1-карбоксамид (4a)

Соединение **4a** получили в соответствии с общей методикой **II** в виде бесцветного пенообразного твердого вещества, выход: 3,15 г (92%), R_f 0,61 (толуол/этилацетат/триэтиламин = 70:30:1). ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): 8,59 (д, $J = 9,3$ Гц, 1H, H10, пирен), 8,50 (т, $J = 5,3$ Гц, 1H, NH), 8,34-8,31 (м, 3H, H3, H6, H8, пирен), 8,25-8,19 (м, 4H, H2, H4, H5, H9, пирен), 8,11 (т, $J = 7,6$ Гц, 1H, H7, пирен), 7,46 (д, $J = 7,3$ Гц, 2H, Ar в Dmt), 7,33-7,30 (м, 6H, Ar в Dmt), 7,24 (м, 1H, Ar в Dmt), 6,92 (д, $J = 8,9$ Гц, 4H, Ar в Dmt), 4,80 (д, $J = 5,6$ Гц, 1H, OH), 3,77-3,72 (м, 1H, CHOH), 3,75 (с, 6H, 2×CH₃ в Dmt) 3,67-3,64 (м, 1H, CH₂NH), 3,21-3,16 (м, 1H, CH₂NH), 3,02 (д, $J = 8,6$ Гц, 1H, CH₂O), 2,91 (д, $J = 8,6$, 1H, CH₂O), 0,99 (с, 3H, CCH₃), 0,96 (с, 3H, CCH₃); ¹³C-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): 168,98 (C=O), 157,91 (2C, Ar в Dmt), 145,34 (Ar в Dmt), 136,04 (Ar в Dmt), 135,96 (Ar в Dmt), 132,08 (C1, пирен), 131,50 (C3a, пирен), 130,68 (C5a, пирен), 130,18 (C8a, пирен), 129,80 (4C, Ar в Dmt), 128,17 (C5, пирен), 127,90 (C9, пирен), 127,82 (2C, Ar в Dmt), 127,69 (2C, Ar в Dmt), 127,17 (C4, пирен), 126,48 (2C, C7, пирен and Ar в Dmt), 125,68 (C6, пирен), 125,50 (C8, пирен), 125,34 (C2, пирен), 124,82 (C10, пирен), 124,30 (C3, пирен), 123,77 (C10b, пирен), 123,64 (C10c, пирен), 113,03 (4C, Ar в Dmt), 85,02 (Ph₃C), 73,73 (CHOH), 68,55 (CH₂O), 54,95 (2C, 2×CH₃ в Dmt), 42,24 (CH₂NH), 38,62 (C(CH₃)₂), 21,69 (CCH₃), 20,85 (CCH₃). MSBP (ESI) m/z: [M+Na]⁺ рассчитано для C₄₄H₄₁NO₅Na, 686,2877; найдено, 686,2873.



(*R*)-*N*-(4-(бис(4-метоксифенил(фенил)метокси)-2-гидрокси-3,3-диметилбутил)-2-(пирен-1-ил)ацетамид (46)

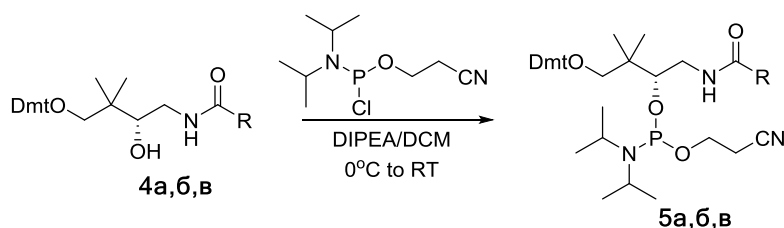
Соединение **46** получили в соответствии с общей методикой **II** в виде зеленого пенообразного твердого вещества, выход: 3,32 г (95%), R_f 0,44 (толуол/этилацетат/триэтиламин = 70:30:1). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,42 (д, $J = 9,2$ Гц, 1H, H10, пирен), 8,27-8,03 (м, 9H, NH, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, пирен), 7,40 (д, $J = 7,7$ Гц, 2H, Ar в Dmt), 7,28-7,26 (м, 6H, Ar в Dmt), 7,19 (т, $J = 7,3$ Гц, 1H, Ar в Dmt), 6,85-6,83 (м, 4H, Ar в Dmt), 4,61 (д, $J = 5,6$ Гц, 1H, OH), 4,24 (с, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 3,69 (с, 3H, CH_3 в Dmt), 3,68 (с, 3H, CH_3 в Dmt), 3,51 (м, 1H, CH_2OH), 3,38 (м, 1H, CH_2NH), 2,91-2,80 (м, 3H, CH_2NH , CH_2O), 0,88 (с, 3H, CCH_3), 0,82 (с, 3H, CCH_3); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 170,22 (C=O), 157,86 (2C, Ar в Dmt), 145,24 (Ar в Dmt), 135,97 (Ar в Dmt), 135,84 (Ar в Dmt), 130,78 (C3a, пирен), 130,32 (C8a, пирен), 129,70 (4C, Ar в Dmt), 129,65 (2C, C1, C5a, пирен), 128,99 (C10a, пирен), 128,61 (C2, пирен), 127,74 (2C, Ar в Dmt), 127,63 (2C, Ar в Dmt), 127,37 (C4, пирен), 127,09 (C9, пирен), 126,73 (C5, пирен), 126,42 (2C, Ar в Dmt), 126,06 (C7, пирен), 124,97 (C6, пирен), 124,80 (C8, пирен), 124,66 (C3, пирен), 124,10 (C10, пирен), 124,08 (C10b, пирен), 123,91 (C10c, пирен), 113,00 (4C, Ar в Dmt), 84,98 (Ph_3C), 73,97 (CH_2O), 68,45 (CH_2O), 54,89 (2C, $2 \times \text{CH}_3$ в Dmt), 41,49 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 40,07 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 38,45 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21,51 (CCH_3), 20,76 (CCH_3). МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{45}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{Na}$, 700,3033; найдено, 700,3029.



(*R,E*)-*N*-(4-(4,4'-диметокситритил)-2-гидрокси-3,3-диметилбутил)-4-((4-диметиламинофенил)азобензамид (4b)

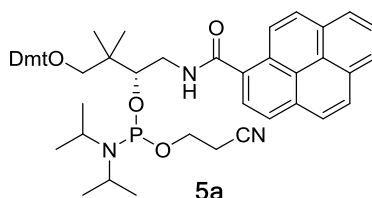
Соединение **4b** получили в соответствии с общей методикой **II** в виде оранжевого пенообразного твердого вещества, выход: 3,42 г (94%), R_f 0,56 (толуол/этилацетат/триэтиламин = 70:30:1). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,38 (т, $J = 5,3$ Гц, 1H, NH), 8,03 (д, $J = 8,5$ Гц, 2H, Ar в Dabcytl), 7,83 (м, 4H, Ar в Dabcytl), 7,43 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H,

Ar в Dmt), 7,31 (м, 6H, Ar в Dmt), 7,21 (т, $J = 7,3$ Гц, 1H, Ar в Dmt), 6,90 (д, $J = 8,9$ Гц, 4H, Ar в Dmt), 6,84 (д, $J = 9,2$ Гц, 2H, Ar в Dabcy1), 4,76 (д, $J = 5,2$ Гц, 1H, OH), 3,73 (с, 6H, $2 \times \text{CH}_3$ в Dmt), 3,65 (м, 1H, CH_2OH), 3,57 (м, 1H, CH_2NH), 3,07 (с, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$ в Dabcy1), 3,07 (м, 1H, CH_2NH), 2,97 (д, $J = 8,5$ Гц, 1H, CH_2O), 2,85 (д, $J = 8,5$ Гц, 1H, CH_2O), 0,94 (с, 3H, CH_3C), 0,92 (с, 3H, CH_3C)⁴ ¹³C-ЯМР (DMCO-*d*₆, δ): 165,85 (C=O), 157,90 (2C, Ar в Dmt), 153,89 (Ar в Dabcy1), 152,77 (Ar в Dabcy1), 145,32 (Ar в Dmt), 142,64 (Ar в Dabcy1), 136,03 (Ar в Dmt), 135,95 (Ar в Dmt), 134,92 (Ar в Dabcy1), 129,77 (2C, Ar в Dmt), 128,35 (2C, Ar в Dabcy1), 127,80 (2C, Ar в Dmt), 127,60 (2C, Ar в Dmt), 126,45 (2C, Ar в Dmt), 125,02 (2C, Ar в Dabcy1), 121,40 (2C, Ar в Dabcy1), 113,00 (4C, Ar в Dmt), 111,52 (2C, Ar в Dabcy1), 85,01 (Ph_3C), 73,59 (CHOH), 68,44 (CH_2O), 54,95 (2C, $2 \times \text{CH}_3$ в Dmt), 42,24 (CH_2NH), 39,77 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ в Dabcy1), 38,49 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21,81 (CCH_3), 20,63 (CCH_3). МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{42}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_5$, 687,3541; найдено, 687,3527.



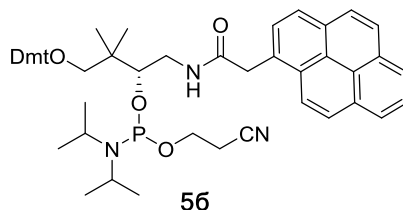
Общая методика III: получение фосфамидитов

В высушенный сосуд Шленка с магнитной мешалкой внесли в противотоке аргона Dmt-защищенный предшественник **4** (1 ммоль), предварительно выдержанный над P_2O_5 в вакуум-эксикаторе, свежеперегнанный ДХМ (10 мл) и DIPEA (260 мкл, 1,5 ммоль). Реактор продули аргоном и закрыли септой, охладили на ледяной бане и внесли 2-цианозтил *N,N*-диизопропилхлорофосфамидит (270 мкл, 1,2 ммоль) по каплям. Реакционную смесь перемешивали 10 мин при охлаждении и 40 мин при комнатной температуре. Смесь разбавили толуолом (80 мл), промыли насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×100 мл), водой (100 мл) и рассолом NaCl (50 мл). Органическую фазу профильтровали через хлопковый фильтр и упарили досуха. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали смесью толуол/этилацетат/триэтиламин с линейным градиентом от 88:10:2 до 68:30:2. Чистый продукт лиофилизировали из безводного бензола.



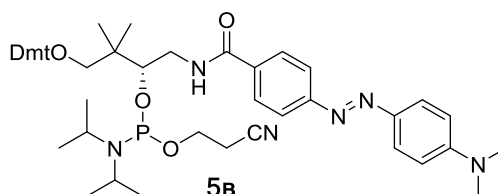
(R)-4-(Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)-3,3-диметил-1-(пирен-1-карбоксамидо)бутан-2-ил(2-цианоэтил)диизопропилфосфамидит (5a)

Соединение **5a** получили в соответствии с общей методикой **III** в виде белой твердой массы, выход: 800 мг (84%), R_f 0,63, 0,81 диастереомеры (толуол/этилацетат/триэтиламин = 55:40:5). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,63-8,55 (м, 1H), 8,41 (т, 0,4 H), 8,37-8,31 (м, 3H), 8,28-8,09 (м, 5H), 8,00 (т, 0,4H), 7,44 (м, 2H), 7,34-7,25 (м, 7H), 6,88 (м, 4H), 4,07-3,99 (м, 1H), 3,81-3,40 (м, 12H), 3,15-3,08 (м, 1H), 2,97-2,91 (м, 1H), 2,59 (т, $J = 6,0$ Гц, 1H), 2,22-2,05 (м, 1H), 1,14 (с, 1H), 1,07-0,97 (м, 15H); ^{31}P -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 149,35 (0,47P), 148,29 (0,53P), диастереомеры. МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{53}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$, 864,4136; найдено, 864,4143.



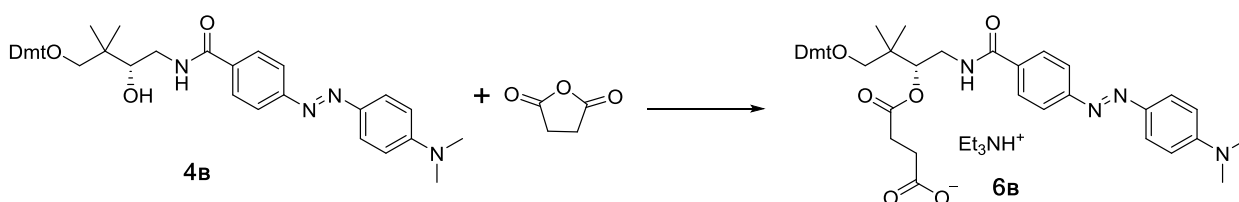
(R)-4-(Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)-3,3-диметил-1-(пирен-1-ил)ацетиамидо)бутан-2-ил(2-цианоэтил)диизопропилфосфамидит (5b)

Соединение **5b** получили в соответствии с общей методикой **III** в виде зеленой твердой массы, выход: 1220 мг (82%), R_f 0,54, 0,74 диастереомеры (толуол/этилацетат/триэтиламин = 55:40:5). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,36-8,20 (м, 4H), 8,17-8,13 (м, 3H), 8,07-8,03 (м, 1H), 7,99-7,96 (м, 1H), 7,61 (т, $J = 5,5$ Гц, 0,4H), 7,36-7,34 (м, 1H), 7,28-7,16 (м, 7 H), 6,84-6,80 (м, 4H), 4,21 (м, 1H), 4,16 (м, 0,65 H), 3,76-3,60 (м, 7H), 3,47-3,35 (м, 2H), 3,30-3,14 (м, 3H), 2,93 (м, 1H), 2,79-2,58 (м, 2H), 2,41 (т, $J = 6,0$ Гц, 0,7 H), 1,18-0,77 (м, 18H); ^{31}P -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 149,48 (0,59P), 148,30 (0,41P), диастереомеры. МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{54}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$, 878,0702; найдено, 878,0709.



(R)-4-(Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)-1-(4-((E)-4-(диметиламино)фенил)дiazенил)бензамидо)-3,3-диметилбутан-2-ил(2-цианоэтил)диизопропилфосфамидит (5в)

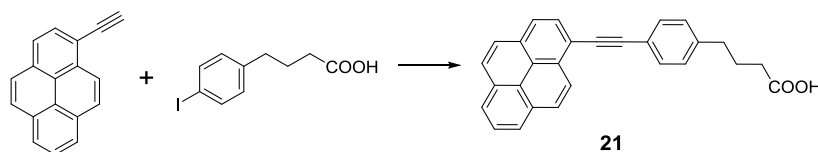
Соединение **5в** получили в соответствии с общей методикой **III** в виде оранжевой твердой массы, выход (700 мг, 86%). R_f 0,61, 0,74 диастереомеры (толуол/этилацетат/триэтиламин = 55:40:5). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,29 (м, 0,4 Н), 7,97-7,93 (м, 2,4 Н), 7,85-7,79 (м, 4Н), 7,43-7,40 (м, 2Н), 7,31-7,19 (м, 7Н), 6,89-6,84 (м, 6Н), 3,97-3,90 (м, 1Н), 3,73 (с, 6Н), 3,70-3,32 (м, 6Н), 3,10-3,04 (м, 1Н), 3,08 (с, 6Н), 2,89 (м, 1Н), 2,60-2,51 (м, 2Н), 1,08-0,91 (м, 18Н); ^{31}P -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 149,77 (0,58P), 148,63 (0,42P), диастереомеры. МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{51}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_6\text{P}$, 887,4619; найдено, 887,4632.



Триэтиламмоний (R,E)-4-((3,3-диметил-1-(4-(4-(диметиламино)азобензамидино)-4-(4,4'-диметокситритил)-бутан-2-ил)окси)-4-оксобутаноат (6в)

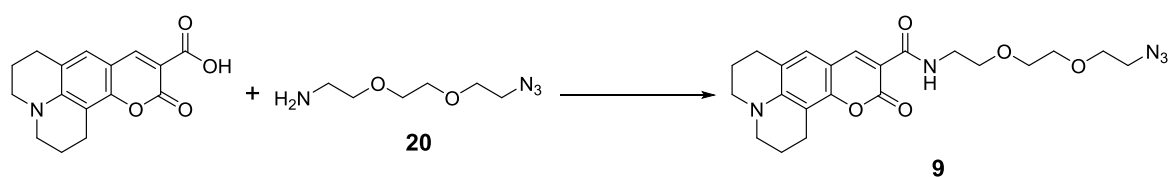
Соединение **4в** (1,375 г, 2,0 ммоль) растворили в абс. пиридине (10 мл), добавили триэтиламин (0,55 мл, 4,0 ммоль), DMAP (250 мг, 2,0 ммоль) и свежеперекристаллизованный янтарный ангидрид (1,0 г, 10 ммоль). Реакционную смесь оставили перемешиваться 48 ч при комнатной температуре. Затем разбавили этилацетатом (200 мл) и встряхивали в делительной воронке с насыщенным раствором бикарбоната натрия (300 мл) 30 мин. Органическую фазу отделили и промыли насыщенным раствором бикарбонатом натрия (2×100 мл), раствором 5% лимонной кислоты (3×100 мл), водой (200 мл), насыщенным раствором NaCl (50 мл), высушили Na_2SO_4 и упарили с несколькими каплями триэтиламина. Продукт выделяли хроматографически на силикагеле, элюент ДХМ/метанол/триэтиламин = 95:5:0,5. Чистый продукт вспенивали упаривая с ДХМ и несколькими каплями триэтиламина, следы растворителей удаляли в вакууме масляного насоса. Выход: 1,58 г (89%) оранжевое твердое вещество R_f 0,61 (ДХМ/метанол/триэтиламин = 95:5:0,5). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,52 (т, $J = 5,6$ Гц, 1Н,

NH), 7,93 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H, Ar в DabcyI), 7,80 (м, 4H, Ar в DabcyI), 7,41 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H, Ar в Dmt), 7,32 (т, $J = 7,7$ Гц, 2H), 7,28 (м, 4H, Ar в Dmt), 7,21 (т, $J = 7,3$ Гц, 1H, Ar в Dmt), 6,90 (д, $J = 7,3$ Гц, 4H, Ar в Dmt), 6,84 (д, $J = 9,2$ Гц, 2H, Ar в DabcyI), 5,11 (дд, $J = 9,5$, 1,6 Гц, 1H, CH_2OH), 3,76 (м, 1H, CH_2NH), 3,73 (с, 6H, $2 \times \text{CH}_3$ в Dmt), 3,24 (м, 1H, CH_2NH), 2,85 (м, 2H, CH_2O), 2,58 (кв, $J = 7,2$ Гц, 5,3H, Et_3NH^+), 2,31-2,41 (м, 4H, CH_2CH_2 в сукцинате), 0,97 (т, $J = 7,2$ Гц, 8H, Et_3NH^+ ; с, 3H, CCH_3), 0,92 (с, 3H, CCH_3); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 174,24 (COO^-), 171,83 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}$), 165,82 ($\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 157,96 (Ar в Dmt), 153,87 (Ar в DabcyI), 152,76 (Ar в DabcyI), 144,91 (Ar в Dmt), 142,65 (Ar в DabcyI), 135,64 (Ar в Dmt), 135,59 (Ar в Dmt), 134,93 (Ar в DabcyI), 129,77 (4C, Ar в Dmt), 128,32 (2C, Ar в DabcyI), 127,79 (2C, Ar в Dmt), 127,69 (2C, Ar в Dmt), 126,51 (Ar в Dmt), 125,00 (2C, Ar в DabcyI), 121,36 (2C, Ar в DabcyI), 113,04 (4C, Ar в Dmt), 111,51 (2C, Ar в DabcyI), 85,31 (Ph_3C), 75,99 ($\text{CHOC}(\text{O})$), 67,73 (CH_2O), 54,95 (2C, $2 \times \text{CH}_3\text{O}$ в Dmt), 45,33 (2,67 C, $3 \times \text{CH}_3$ в Et_3NH^+), 39,76 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ в DabcyI), 37,72 (CH_2NH), 30,59 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 29,91 (CH_2 в сукцинате), 29,68 (CH_2 в сукцинате), 21,77 (CCH_3), 21,05 (CCH_3), 10,50 (2,67 C, $3 \times \text{CH}_3$ в Et_3NH^+). МСВР (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{46}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_8$, 787,3701; найдено, 787,3688.



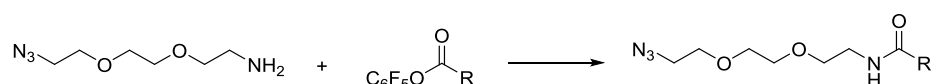
4-(4-(Пирен-1-илэтинил)фенил)бутановая кислота (21)

1-Этинилпирен (2,26 г, 10 ммоль) и (4-йодфенил)масляную кислоту (2,47 г, 8,5 ммоль) растворили в абс. ДМФА (10 мл) и дегазировали под вакуумом. В противотоке аргона внесли $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2]\text{Cl}_2$ (346 мг, 0,5 ммоль), CuI (189 мг, 1 ммоль) и триэтиламин (1,76 мл, 12,8 ммоль) и оставили перемешиваться в инертной атмосфере при комнатной температуре на 12 ч. Реакционную смесь вылили в воду (70 мл), осадок отфильтровали, промыли водой и просушили на воздухе. Полученную смесь разделяли хроматографически на силикагеле, элюируя $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f = 0,56$). Выход: 2,51 г (76%) желтые кристаллы, т. пл. 157–158°C (толуол). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,17-7,99 (м, 6H, пирен), 7,89-7,87 (м, 2H, пирен), 7,71 (д, $J = 8,6$ Гц, 1H, пирен), 7,37 (д, $J = 8,9$ Гц, 2H, C_6H_4), 6,83 (д, $J = 8,9$ Гц, 2H, C_6H_4), 2,60 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H, CH_2), 2,35 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H, CH_2), 1,99–1,91 (м, 2H, CH_2); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 174,10, 143,18, 134,76, 134,50, 131,74, 131,25, 130,57, 129,27, 128,46, 127,16, 127,02, 126,16, 125,83, 125,72, 121,09, 118,38, 118,26, 112,43, 92,50, 85,90, 33,07, 25,80.



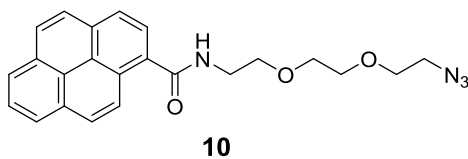
***N*-2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этил)-11-оксо-2,3,6,7-тетрагидро-1Н, 5Н, 11Н-пирано[2,3-*f*]пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-10-карбоксамид (9)**

Кумарин 343 (900 мг, 2 ммоль) растворили в абс. ДМФА (15 мл) и охладили до 0°C. Добавили PyBOP (1090 мг, 2,1 ммоль) и DIPEA (785 мкл, 4,5 ммоль) и оставили перемешиваться на 30 мин при охлаждении. Затем добавили 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **20** (370 мг, 2,1 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре 1,5 ч, вылили в воду (100 мл), экстрагировали этилацетатом (100 мл). Органическую фазу отделили, промывали водой (3×100 мл), 5% раствором лимонной кислоты (100 мл), сушили Na₂SO₄ и упарили в вакууме. Сухой остаток очищали хроматографически на силикагеле, элюировали градиентом метанола в ДХМ от 98:2 до 95:5. Выход: 828 мг (94%) оранжевый порошок, Тпл. 88–89°C (этилацетат/н-гексан); *R_f* 0,53 (ДХМ/метанол, 95:5 v/v). ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): 8,78 (т, *J* = 9,3 Гц, 1H), 8,48 (с, 1H), 7,20 (с, 1H), 3,62–3,52 (м, 8H), 3,45 (м, 2H), 3,37 (м, 2H), 3,30 (м, 4H), 2,70 (м, 4H), 1,86 (м, 4H); ¹³C-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): 131,0, 130,8, 130,3, 129,7, 129,0, 128,6, 127,4, 127,2, 126,8, 126,1, 125,1, 124,9, 124,7, 124,1, 124,0, 123,9, 69,6, 69,2, 69,1, 49,9, 40,0, 38,8



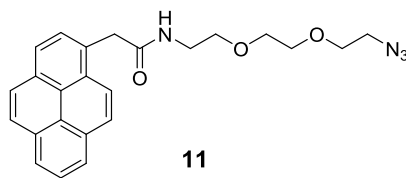
Общая методика IV: ацилирование 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-амина пентафторфениловыми эфирами

Пентафторфениловый эфир карбоновой кислоты (5 ммоль), аминоазид **20** (1,05 г, 6 ммоль) и триэтиламин (1,0 мл, 7 ммоль) растворили в ДХМ (100 мл). Реакционную смесь оставили при перемешивании в течение 4 ч при комнатной температуре. Затем сконцентрировали в вакууме, растворили в этилацетате (200 мл), промыли водой (200 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (3×100 мл), рассолом NaCl (50 мл), сушили Na₂SO₄ и упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюент ДХМ/метанол = 98:2. Полученное желтое масло кристаллизовали, перетирая с н-гексаном. Белые кристаллы отфильтровывали, промывали холодным н-гексаном, сушили на воздухе.



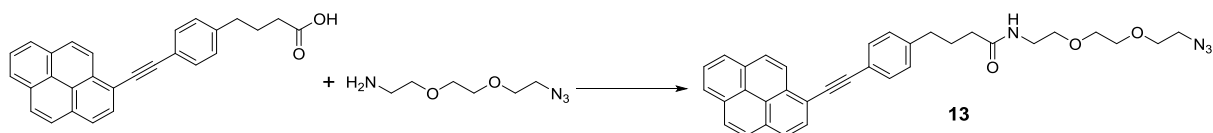
***N*-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)пирен-1-карбоксамид (10)**

Соединение **10** получили в соответствии с общей методикой **IV** в виде белого порошка, выход: 1,87 г (94%), $R_f = 0,23$ (ДХМ/метанол = 98:2), т. пл. 41–43°C (н-гексан). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ): 8,55 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H, пирен), 8,20–7,99 (м, 8H, пирен), 6,83 (ушир. с, 1H, NH), 3,82–3,54 (м, 10H, $5 \times \text{CH}_2$), 3,18 (с, 2H, CH_2); ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , δ): 169,97, 132,34, 130,98, 130,74, 130,50, 128,46, 128,38, 127,00, 126,17, 125,66, 125,56, 124,62, 124,31, 124,18, 70,46, 70,22, 69,92, 69,83, 50,37, 39,95.



***N*-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)-2-(пирен-1-ил)ацетамид (11)**

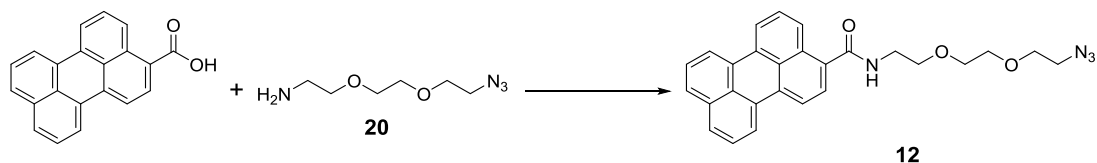
Соединение **11** получили в соответствии с общей методикой **IV** в виде желтого порошка, выход: 1,91 г (92%), $R_f = 0,14$ (ДХМ/метанол = 98:2), т. пл. 54–55°C (н-гексан). ^1H -ЯМР ($\text{DMCO}-d_6$, δ): 8,39 (д, $J = 9,3$ Гц, 1H, NH), 8,29–8,20 (м, 5H, пирен), 8,15 (с, 2H, CH_2), 8,08–8,01 (м, 2H, пирен), 4,21 (с, 2H, CH_2CO), 3,51 (м, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 3,46–3,43 (т, $J = 5,8$ Гц, 2H, CH_2), 3,36–3,33 (м, 2H, CH_2), 3,28–3,24 (кв, $J = 5,6$ Гц, 2H, CH_2); ^{13}C -ЯМР ($\text{DMCO}-d_6$, δ): 130,98, 130,80, 130,34, 129,69, 128,95, 128,60, 127,36, 127,16, 126,79, 126,14, 125,05, 124,87, 124,72, 124,09, 124,01, 123,91, 69,57, 69,18, 69,11, 49,94, 40,02, 38,79.



***N*-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)-4-(4-(пирен-1-илэтинил)фенил)бутанамид (13)**

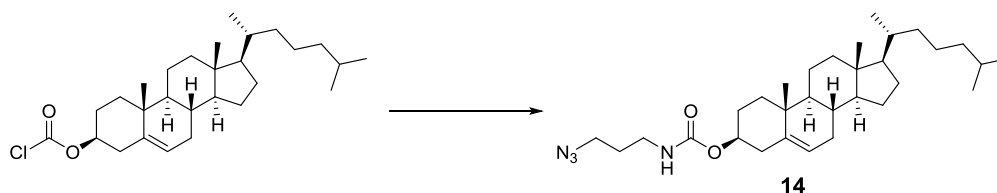
Соединение **13** получили в соответствии с общей методикой **IV** в виде белых кристаллов, выход: 2,55 г (94%), $R_f = 0,32$ (ДХМ/метанол = 98:2), т. пл. 61–62°C (гексан). ^1H -ЯМР ($\text{DMCO}-d_6$, δ): 8,61 (д, $J = 9,0$ Гц, 1H, пирен), 8,39–8,11 (м, 8H, пирен), 7,85 (т, $J =$

5,5 Гц, 1H, NH), 7,69 (д, $J = 8,0$ Гц, 2H, C₆H₄), 7,33 (д, $J = 8,1$ Гц, 2H, C₆H₄), 3,60-3,52 (м, 6H, 3×CH₂), 3,43 (т, $J = 5,9$ Гц, 2H, CH₂), 3,38 (т, $J = 4,8$ Гц, 2H, CH₂), 3,22 (кв, $J = 5,8$ Гц, 2H, CH₂), 2,64 (т, $J = 7,7$ Гц, 2H, CH₂), 2,13 (т, $J = 7,5$ Гц, 2H, CH₂), 1,88–1,80 (м, 2H, CH₂); ¹³C-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): 171,87, 143,15, 131,57, 131,06, 130,92, 130,84, 130,56, 129,57, 128,94, 128,85, 128,37, 127,28, 126,80, 126,03, 125,98, 124,99, 124,88, 123,72, 123,47, 119,87, 116,98, 95,49, 87,78, 69,61, 69,54, 69,22, 69,17, 49,96, 38,44, 34,65, 34,52, 26,75.



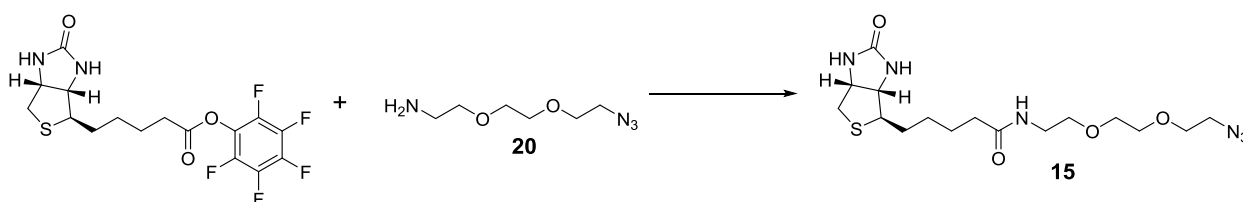
N-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этил)перилен-3-карбоксамид (**12**)

Перилен-3-карбоновую кислоту (600 мг, 2,0 ммоль) суспендировали в сухом ДХМ (50 мл) и добавили тионилхлорид (440 мкл, 6 ммоль) и несколько капель абс. ДМФА. В реакционную колбу вставили обратный холодильник с хлоркальциевой трубкой и кипятили содержимое в течение 3 ч до полного растворения кислоты. Смесь охладили до комнатной температуры и упарили в вакууме масляного насоса. Остаток хлорангидрида снова растворили в сухом ДХМ (10 мл) и охладили на ледяной бане. Затем добавили 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **20** (380 мг, 2,2 ммоль) и DIPEA (440 мкл, 2,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 30 мин и упарили. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали линейным градиентом этилацетата в хлороформе от 10/90 до 40/60. Полученное соединение после упаривания перетирали со смесью 1:1 диэтилового эфира и *n*-гексана (10 мл) и отфильтровывали, промывали *n*-гексаном и сушили на воздухе. Выход: 630 мг (70%) желтые кристаллы, т. пл. 112–114°C (толуол). ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): 8,59 (т, $J = 5,5$ Гц, 1H, NH), 8,41-8,36 (м, 4H, перилен), 8,08 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H, перилен), 7,82 (т, $J = 8,5$ Гц, 2H, перилен), 7,59-7,54 (м, 4H, перилен), 3,64-3,61 (м, 8H, 4×CH₂), 3,50 (м, 2H, CH₂), 3,38 (м, 2H, CH₂).



(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-Диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (3-азидопропил)карбамат (14)

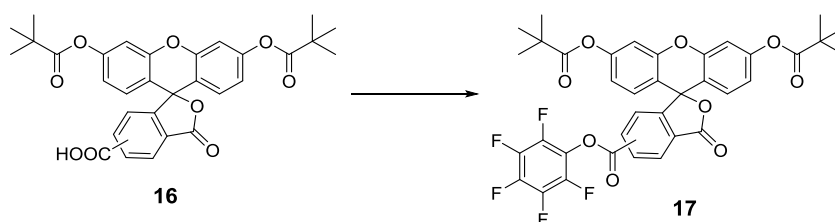
Холестерилхлорформиат (674 мг, 1,5 ммоль) растворили в ТГФ (25 мл). 3-Азидопропил-1-амин (158 мг, 1,6 ммоль) добавили вслед за триэтиламино (251 мкл, 1,8 ммоль). По мере протекания реакции образовывался белый кристаллический осадок. Реакцию выдерживали 2 ч при перемешивании, затем вылили в этилацетат. Органический раствор промывали водой (100 мл), водным раствором 5% лимонной кислоты (100 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (100 мл), сушили Na_2SO_4 , упарили досуха. Продукт выделяли хроматографически на силикагеле, элюент ДХМ/этилацетат = 95:5 (R_f = 0,65). Продукт перекристаллизовали из минимального объема н-гексана, после охлаждения до $+4^\circ\text{C}$ бесцветные иглы отфильтровали и промыли небольшими порциями холодного н-гексана и сушили на воздухе. Выход: 410 мг (54%) бесцветные игольчатые кристаллы, R_f = 0,65 (ДХМ/этилацетат = 95:5), т. пл. $106-108^\circ\text{C}$ (гексан). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ): 5,38-5,37 (м, 1H), 4,78 (м, 1H), 4,52-4,47 (м, 1H), 3,39-3,36 (т, J = 6,6 Гц, 2H, CH_2), 3,29-3,24 (м, 2H, CH_2), 2,37-0,91 (м, 36H), 0,88-0,86 (м, 6H), 0,68 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , δ): 156,14, 139,72, 122,51, 74,40, 56,64, 56,10, 49,08, 42,27, 39,70, 39,48, 38,51, 38,32, 36,94, 36,52, 36,15, 35,76, 31,86, 31,83, 29,18, 28,20, 28,11, 27,97, 24,25, 23,80, 22,79, 22,53, 21,00, 19,29, 18,68, 11,82.



***N*-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)-5-((3aS,4R,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)пентанамид (15)**

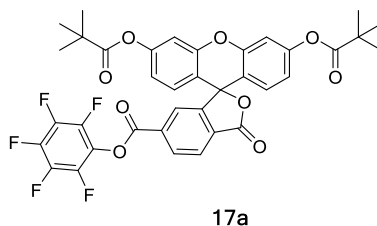
Пентафторфениловый эфир биотина (4,95 г, 12 ммоль) суспендировали в ДХМ (100 мл). 2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этан-1-амин (2,31 г, 13 ммоль) и триэтиламин (2,50 мл, 18 ммоль) добавили к суспензии и оставили перемешиваться при комнатной температуре.

Через 1 ч смесь сконцентрировали в вакууме до сухого остатка. Для удаления аминов продукт перетирали с диэтиловым эфиром (200 мл) и отфильтровали. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюировали линейным градиентом метанола в ДХМ от 95:5 до 90:10 ($R_f = 0,48$ в ДХМ/метанол = 90:10). После упаривания стеклообразный продукт перетирая с диэтиловым эфиром переводили в белый порошок. Продукт отфильтровывали и сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Выход: 3,75 г (78%) белый порошок, $R_f = 0,48$ (ДХМ/метанол = 90:10). 1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 7,81-7,78 (т, $J = 5,1$ Гц, 1H, NH), 6,41 (с, 1H), 6,35 (с, 1H), 4,32-4,29 (м, 1H), 4,13-4,11 (м, 1H), 3,61-3,50 (м, 6H), 3,42-3,37 (м, 4H), 3,21-3,16 (м, 2H), 3,12-3,07 (м, 1H), 2,84-2,80 (м, 1H), 2,59-2,55 (д, $J = 12,4$ Гц, 1H), 2,08-2,04 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H, CH_2), 1,65-1,41 (м, 4H, $2 \times CH_2$), 1,35-1,24 (м, 2H, CH_2). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 172,43, 163,02, 69,94, 69,89, 69,58, 69,52, 61,36, 59,51, 55,74, 50,32, 40,17, 38,75, 35,42, 28,51, 28,36, 25,58.

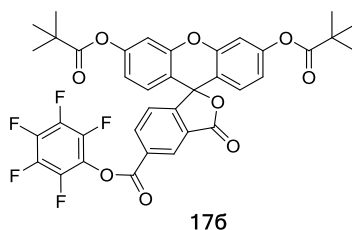


Общая методика V: пентафторфениловые эфиры *O*-дипивалоил-5(6)-карбоксифлуоресцеинов (17)

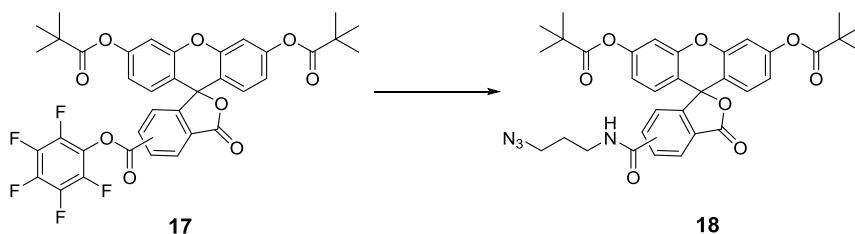
O-Дипивалоил-5(6)-карбоксифлуоресцеин **16** (3,26 г, 6 ммоль) растворили в ДХМ (25 мл) и добавили пентафторфенол (1,22 г, 6 ммоль). Раствор охладили на ледяной бане и добавили раствор ДЦК (1,30 г, 6,3 ммоль) в ДХМ (7 мл). Реакцию оставили перемешиваться на ночь, постепенно поднимая температуру до комнатной. Осадок ДЦМ отфильтровали, промыли небольшим количеством ДХМ. Маточный раствор упарили, остаток растворили в этилацетате (50 мл), оставшуюся ДЦМ отделили фильтрованием, маточный раствор промыли насыщенным раствором бикарбонатом натрия (4×50 мл), водой (2×50 мл), рассолом NaCl (15 мл), сушили Na_2SO_4 и упарили. Остаток пропустили через слой силикагеля, элюировали чистым ДХМ и сконцентрировали в вакууме.



Соединение **17a** получили в соответствии с общей методикой **V** в виде белого твердого пенообразного вещества, выход: 6-изомер **17a** 4,12 г (96%). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ): 8,90 (с, 1H), 8,50 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,40 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H), 7,12 (м, 2H), 6,87-6,83 (м, 4H), 1,39 (с, 18H). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , δ): 176,41, 167,50, 161,06, 158,26, 152,93, 151,45, 137,03, 129,26, 128,65, 128,08, 127,02, 124,96, 117,98, 115,02, 110,58, 82,09, 39,19, 27,01. ^{19}F -ЯМР (CDCl_3 , δ): -152,21 (д, $J = 17,9$ Гц, 2F), -156,84 (т, $J = 21,3$ Гц, 1F), -161,61 (т, $J = 20,6$ Гц, 2F).



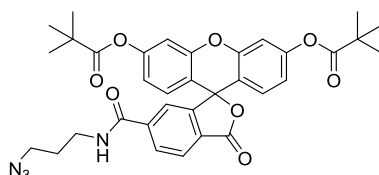
Соединение **17b** получили в соответствии с общей методикой **V** в виде белого порошка, выход: 5-изомер **17b**: 3,95 г (92%). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ): 8,48 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 8,23 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,12 (с, 2H), 6,88-6,85 (м, 4H), 1,38 (с, 18H); ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , δ): 176,40, 167,61, 161,04, 153,47, 152,89, 151,51, 133,30, 132,22, 130,88, 128,69, 126,29, 125,88, 117,99, 115,08, 110,55, 82,21, 39,18, 27,00; ^{19}F -ЯМР (CDCl_3 , δ): -151,86 (д, $J = 19,3$ Гц, 2F), -156,80 (т, $J = 22,0$ Гц, 1F), -161,67 (м, 2F).



Общая методика VI: *O*-дипивалоил-5(6)-(3-азидопропил)-амидофлуоресцеины (**18**)

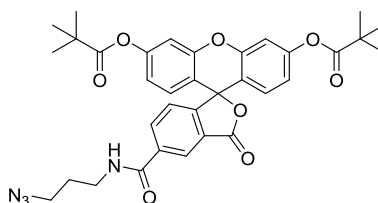
Пентафторфениловый эфир *O*-дипивалоил-5(6)-карбоксифлуоресцеина **17** (3,85 г, 6 ммоль) растворили в ДХМ (50 мл), охладили на ледяной бане и добавили 3-азидопропил-1-амин (630 мг, 6,3 ммоль) и триэтиламин (0,92 мл, 6,6 ммоль). Реакционную смесь

перемешивали в течение ночи, постепенно поднимая температуру до комнатной. Затем разбавили этилацетатом (300 мл), промыли водой (2×200 мл), раствором 5% лимонной кислоты (100 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (100 мл), рассолом NaCl (50 мл), сушили Na_2SO_4 и упарили. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюент 10% этилацетата в ДХМ.



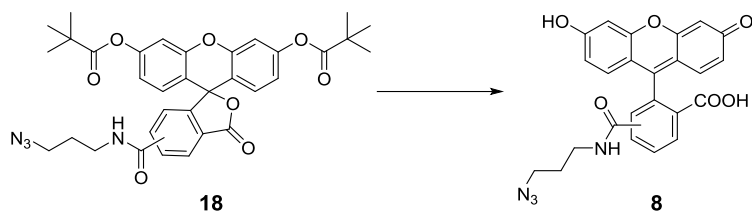
18a

Соединение **18a** получили в соответствии с общей методикой **VI** в виде белого порошка, выход: 3,68 г (99%), $R_f = 0,49$ (EtOAc/ДХМ = 1:9). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,72 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H, NH), 8,22-8,20 (м, 1H), 8,16-8,14 (м, 1H), 7,76 (с, 1H), 7,27 (с, 2H), 6,94 (с, 4H), 3,34 (т, $J = 6,9$ Гц, 2H, CH_2), 3,26 (кв, $J = 6,6$ Гц, 2H, CH_2), 1,71 (квинт, $J = 6,9$ Гц, 2H, CH_2), 1,30 (с, 18H, 2×пивалоил). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 175,93, 167,75, 164,46, 152,44, 152,36, 150,81, 141,10, 129,89, 129,36, 127,44, 125,33, 122,23, 118,54, 115,68, 110,33, 81,17, 48,45, 38,63, 36,85, 28,14, 26,64.



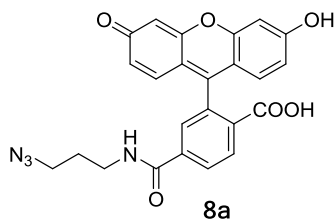
18b

Соединение **18b** получили в соответствии с общей методикой **VI** в виде белого порошка, выход: 3,26 г (87%), $R_f = 0,45$ (EtOAc/ДХМ = 1:9). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,90 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H, NH), 8,54 (с, 1H), 8,30-8,28 (м, 1H), 7,52-7,50 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H), 7,27 (с, 2H), 6,94 (м, 4H), 3,47-3,43 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H, CH_2), 3,42-3,37 (кв, $J = 6,6$ Гц, 2H, CH_2), 1,86-1,79 (квинт, $J = 6,7$ Гц, 2H, CH_2), 1,31 (с, 18 H, 2×пивалоил); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 175,94, 167,90, 164,53, 154,26, 152,46, 150,83, 136,61, 135,06, 129,22, 125,80, 124,29, 123,71, 118,50, 115,66, 110,37, 81,18, 48,48, 38,64, 36,84, 28,25, 26,66.

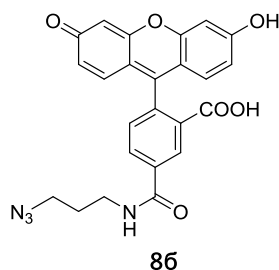


Общая методика VII: 5(6)-(3-Азидопропил)-амидофлуоресцеины (8)

O-Дипивалоил-5(6)-карбоксифлуоресцеин азид **18** (3,13 г, 5,0 ммоль) в ТГФ (25 мл) смешали с насыщенным водным раствором аммиака (10 мл). Реакцию выдерживали 48 ч при комнатной температуре перемешивая до полноты конверсии (ТСХ: ДХМ/метанол/триэтиламин = 90:10:0,5, $R_f = 0,39$). Газообразный аммиак и ТГФ сконцентрировали в вакууме водоструйного насоса, остаток разбавили водой до 50 мл объема. Полученный раствор подкисляли 10% соляной кислотой до полного выпадения осадка. Продукт отфильтровали, промыли холодной водой (6×20 мл), высушили на фильтре и промыли небольшими порциями диэтилового эфира. Полученный желтый кристаллический продукт сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 .

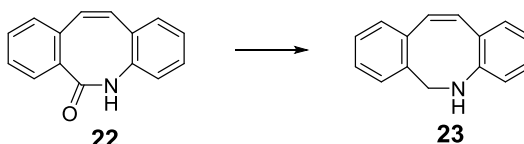


Соединение **8a** получили в соответствии с общей методикой VII в виде желтого порошка, выход: 1,90 г (83%). 1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,74 (т, $J = 5,4$ Гц, 1H, NH), 8,18 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H), 8,08 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H), 7,67 (с, 1H), 6,72 (с, 2H), 6,61-6,55 (м, 4H), 3,35 (т, $J = 6,7$ Гц, 2H), 3,27 (кв, $J = 6,5$ Гц, 2H), 1,72 (квинт, $J = 6,7$ Гц, 2H). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 168,04, 164,61, 159,73, 151,89, 140,65, 129,42, 129,27, 128,24, 124,90, 122,30, 112,81, 109,20, 102,27, 48,49, 36,87, 28,17.



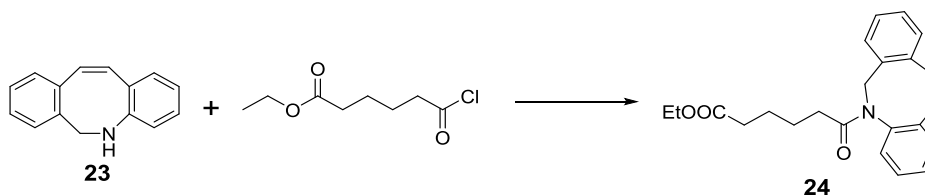
Соединение **86** получили в соответствии с общей методикой VII в виде желтого порошка, выход: 2,04 г (89%). 1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,90 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H, NH), 8,47 (с,

1H), 8,25 (д, $J = 9,1$ Гц, 1H), 7,38 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H), 6,73-6,55 (м, 6H), 3,46-3,35 (м, 2H, $2 \times \text{CH}_2$), 1,82 (квинт, $J = 6,7$ Гц, 2H, CH_2). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 168,19, 164,75, 159,87, 151,95, 134,69, 135,25, 129,19, 126,55, 124,35, 123,43, 112,84, 109,20, 102,33, 48,53, 36,85, 28,30.



5,6-Дигидродибензоазоцинон (23)

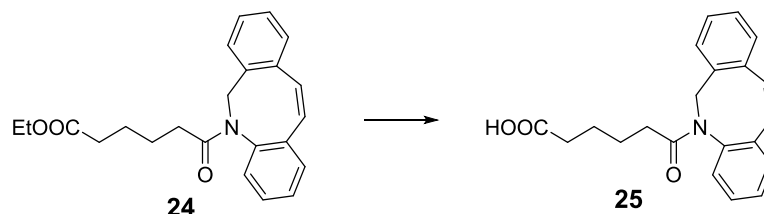
Дибензоазоцинон **22** (4,40 г, 20 ммоль) суспендировали в сухом эфире (150 мл), охладили на ледяной бане и порционно добавляли литийалюминийгидрид (1,65 г, 42 ммоль), продувая реактор азотом. После прибавления смесь кипятили 20 ч в инертной атмосфере. Реакционную смесь разлагали 10% раствором NaOH. После обработки реакционную массу отфильтровали, маточный раствор сушили NaOH, отфильтровали и упарили досуха. Сухой остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали смесью толуол/этилацетат = 9:1. Выход: 3,78 г (91%) желтые кристаллы, $R_f = 0,63$ (толуол/ацетон = 4:1). ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 7,26-7,16 (м, 3H), 7,13-7,11 (м, 1H), 6,89-6,83 (м, 1H), 6,81-6,77 (м, 1H), 6,52-6,40 (м, 3H), 6,25-6,21 (м, 2H), 4,45 (д, $J = 7,1$ Гц, 2H); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 148,25, 139,09, 138,48, 134,52, 133,07, 129,63, 129,30, 127,77, 127,36, 127,12, 126,29, 120,11, 117,22, 115,88, 47,93.



Этил 6-дибензоазоцин-5(6H)-ил-6-оксогексаноат (24)

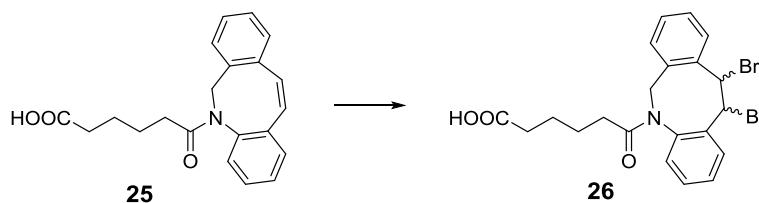
Дибензоазоцин **23** (3,75 г, 16 ммоль) растворили в свежеперегнанном ДХМ (50 мл), добавили триэтиламин (5,0 мл, 32 ммоль). Реакционную смесь охладили до 0°C , этиловый эфир адипоилхлорида (4,61 г, 24 ммоль) добавили по каплям. Реакцию выдерживали при перемешивании 30 мин при охлаждении и 2,5 ч при комнатной температуре. Добавили воду (5 мл), ДХМ упарили в вакууме, остаток растворили в этилацетате (200 мл), промывали водой (100 мл), 1M NaOH (3×100 мл), раствором 5% лимонной кислоты (50

мл), раствором NaCl (50 мл), сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Продукт разделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали смесью толуол/ацетон = 5:1. Выход: 5,32 г (92%) желтое масло, R_f = 0,63 (толуол/ацетон = 4:1). ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): δ = 7,39-7,31 (м, 4H), 7,28 (д, *J* = 6,6 Гц, 1H), 7,21-7,14 (м, 3H), 6,77 (д, *J* = 13,2 Гц, 1H), 6,65 (д, *J* = 13,2 Гц, 1H), 5,38 (д, *J* = 15,2 Гц, 1H), 3,99 (кв, *J* = 7,14 Гц, 2H), 2,09 (т, *J* = 7,2 Гц, 2H), 1,97-1,90 (м, 1H), 1,77-1,71 (м, 1H), 1,37-1,24 (м, 4H), 1,14 (т, 3H).



6-Дибензоазоцин-5(6H)-ил-6-оксогексановая кислота (25)

К раствору этилового эфира **24** (5,41 г, 15 ммоль) в *i*PrOH (30 мл) прибавили по каплям раствор NaOH (2,4 г, 60 ммоль) в воде (15 мл) при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 50°C, затем охладили и сконцентрировали в вакууме на 2/3. Остаток разбавили 5% лимонной кислотой (300 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×200 мл). Эфирные фракции объединили, промыли водой (200 мл), раствором NaCl (50 мл), сушили Na₂SO₄ и упарили досуха. Продукт перекристаллизовали из этилацетата (60 мл). Осадок отфильтровали, промыли небольшим количеством холодного этилацетата. Дополнительное количество продукта было извлечено из маточного раствора после концентрирования и перекристаллизации из этилацетата (30 мл). Выход: 4,62 (92%) бежевые кристаллы, т. пл. 102-104°C (этилацетат), R_f 0,55 (ДХМ/метанол = 95:5). ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): δ = 11,93 (с, 1H), 7,39-7,31 (м, 4H), 7,28 (д, *J* = 6,5 Гц, 1H), 7,21-7,15 (м, 3H), 6,77 (д, *J* = 13,0 Гц, 1H), 6,65 (д, *J* = 13,2 Гц, 1H), 5,39 (д, *J* = 15,4 Гц, 1H), 4,18 (д, *J* = 15,4 Гц, 1H), 2,02 (т, *J* = 7,3 Гц, 2H), 1,96-1,90 (м, 1H), 1,77-1,71 (м, 1H), 1,37-1,32 (м, 2H), 1,28-1,22 (м, 2H).



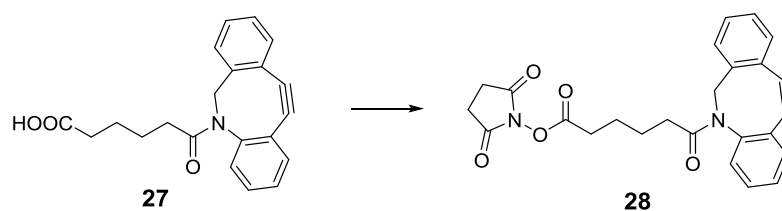
6-(11,12-Дибром-11,12-дигидродибензоазоцин-5(6H)-ил-6-оксогексановая кислота (26)

В круглодонную колбу поместили алкен **25** (4,52 г, 13,5 ммоль) в ДХМ (200 мл). Колбу заполнили аргоном и охладили до 0°C; раствор брома (2,08 мл, 40,5 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавили по каплям при перемешивании. Через 3 ч реактор извлекли из охлаждающей бани и смесь вылили в воду (300 мл). Водный слой экстрагировали ДХМ (200 мл). Органические фазы объединили, промыли 5% водным Na₂SO₃ (2×100 мл), рассолом NaCl (100 мл), сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме, следы ДХМ удалили в вакууме масляного насоса. Продукт нестабилен и использовали немедленно в следующей стадии. Выход: 6,05 г (99%, два диастереомера) белая твердая масса, R_f 0,58 (ДХМ/метанол = 95:5). ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): δ = 7,65 (д, J = 7,7 Гц, 1H), 7,32-7,16 (м, 5H), 7,08 (т, J = 7,1 Гц, 1H), 7,00 (д, J = 7,6 Гц, 1H), 5,86 (д, J = 9,9 Гц, 1H), 5,76-5,70 (м, 2H), 4,21 (д, J = 14,8 Гц, 1H), 2,30 (м, 0,5H), 2,21 (т, J = 7,3 Гц, 2H), 2,14-2,03 (м, 2H), 1,64-1,40 (м, 4H).



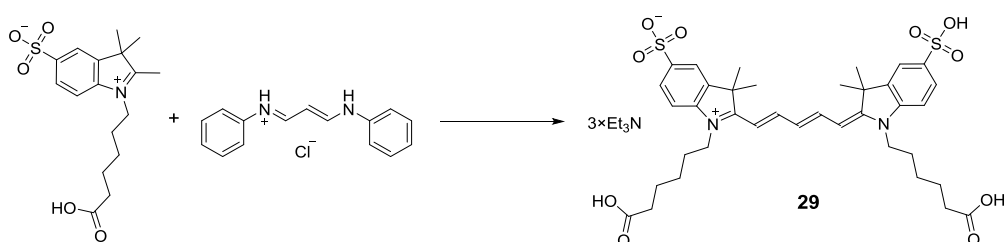
6-(11,12-Дидегидродибензоазоцин-5(6H)-ил-6-оксогексановая кислота (**27**)

В сосуд Шленка с магнитной мешалкой, высушенный в пламени, поместили дибромид **26** (6,0 г, 13,3 ммоль) и абс ТГФ (180 мл). Реактор продували аргоном и охладили до -40°C. 1 М раствор tBuOK в абс. ТГФ (23,3 мл, 23,3 ммоль) добавили по каплям. Через 1,5 ч добавили еще 1М tBuOK в ТГФ (7,0 мл, 7,0 ммоль) и выдержали 30 мин при перемешивании. Реактор извлекли из охлаждающей бани и нагрели до комнатной температуры. Реакционную массу нейтрализовали 1М NaHSO₄ (300 мл) до pH 1-2. Водную фазу отделили и экстрагировали ДХМ (200+100+100 мл), органические слои объединили, промыли водой (300 мл), рассолом NaCl (150 мл). сушили Na₂SO₄ и упарили досуха. Продукт вспенили, упаривая с ДХМ, следы растворителей удаляли в вакууме масляного насоса. Выход: 4,25 г (96%) серая твердая масса, R_f 0,55 (ДХМ/метанол = 95:5). ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): δ = 11,90 (с, 1H), 7,60 (д, J = 7,4 Гц, 1H), 7,56-7,52 (м, 1H), 7,38-7,25 (м, 3H), 5,02 (д, J = 14,0 Гц, 1H), 3,57 (д, J = 14,0 Гц, 1H), 2,19-2,12 (м, 1H), 1,95 (т, J = 6,9 Гц, 2H), 1,78-1,72 (м, 1H) 1,33-1,14 (м, 4H); ¹³C-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): δ = 174,16, 171,60, 151,83, 148,44, 132,42, 129,45, 128,87, 128,10, 128,00, 127,66, 126,79, 125,16, 122,52, 121,44, 114,41, 108,20, 54,78, 33,82, 33,24, 24,37, 23,75.



Активированный эфир дибензоциклооктинациклооктина (**28**; ADIBO NHS)

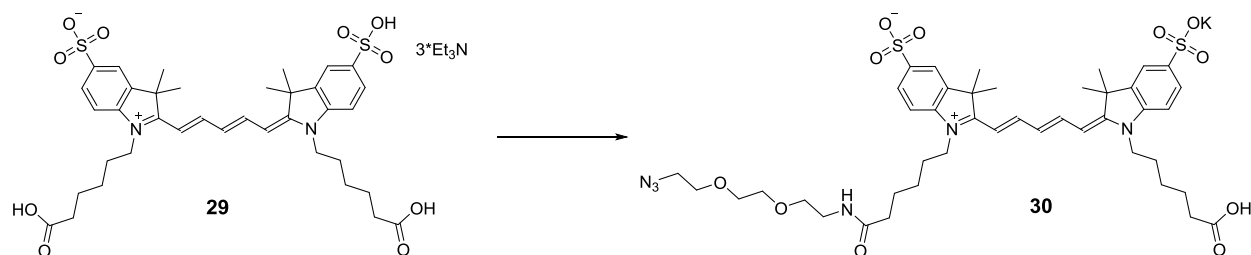
Соединение **27** (4,0 г, 12 ммоль) растворили в свежеперегнанном ДХМ (50 мл), добавили DIPEA (2,51 мл, 14,4 ммоль) и TSTU (4,33 г, 14,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч до полной конверсии. Затем реакционную массу разбавили ДХМ до объема 150 мл, промыли 5% лимонной кислотой (150 мл), водой (100 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×100 мл), раствором NaCl (50 мл), сушили Na₂SO₄ и упарили. Продукт очищали хроматографически на силикагеле, элюент толуол/ацетон = 6:1. Фракции содержащие незагрязненный продукт объединили, упарили, вспенили упаривая с ДХМ. Высушили в вакууме масляного насоса. Выход: 3,14 г (61%) серая твердая масса. ¹H-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): δ = 7,63 (д, *J* = 7,4 Гц, 1H), 7,59-7,57 (м, 1H), 7,51-7,45 (м, 3H), 7,40-7,29 (м, 3H), 5,04 (д, *J* = 14,0 Гц, 1H), 3,61 (м, *J* = 13,9 Гц, 1H), 2,78 (с, 4H), 2,43 (т, *J* = 6,8 Гц, 2H), 2,25-2,20 (м, 1H), 1,80-1,74 (м, 1H) 1,42-1,29 (м, 4H); ¹³C-ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ): δ = 171,38, 170,16, 168,62, 151,74, 148,38, 132,40, 129,44, 128,89, 128,11, 127,99, 127,67, 126,80, 125,16, 122,45, 121,39, 114,39, 108,16, 54,78, 33,51, 29,76, 25,40, 23,90, 23,42.



1-(5-Карбоксипентил)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(5-карбоксипентил)-3,3-диметил-5-сульфоиндолин-2-илиден)пента-1,3-диен-1-ил)-3,3-диметил-3H-индол-1-ий-5-сульфоната триэтиламмоний (**29**)

Раствор 1-(5-карбоксипентил)-5-сульфо-2,3,3-триметилиндолина (7,10 г, 20 ммоль) и гидрохлорида дианилида малондиальдегида (2,45 г, 9,5 ммоль) в пиридине (10 мл), пропионовом ангидриде (10 мл) и уксусной кислоте (10 мл) нагревали до 120°C в течение 4 ч при перемешивании в атмосфере аргона. Затем охладили до комнатной

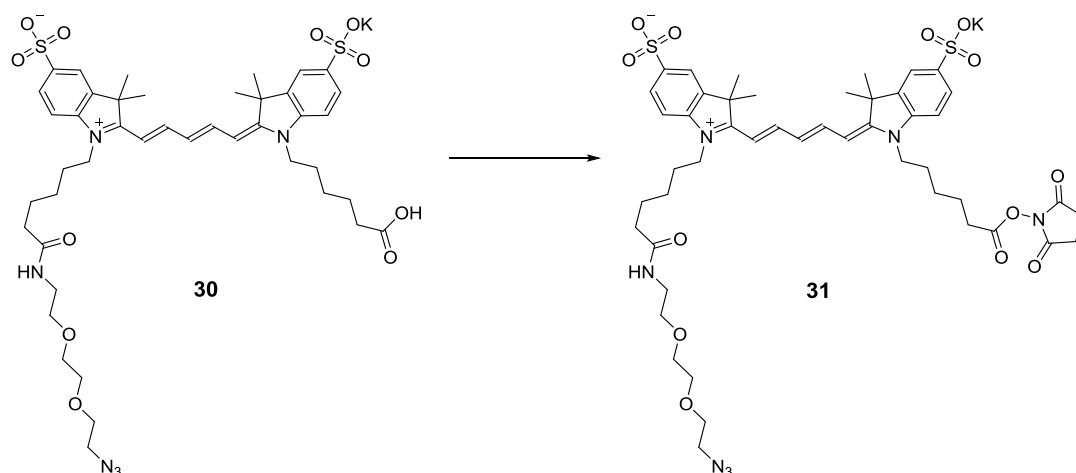
температуры и добавили по каплям к раствору триэтиламина (10 мл) в этилацетате (200 мл). Перемешивали 1 ч, затем выделившийся осадок отфильтровали, промыли этилацетатом (100 мл) и высушили в вакууме. Полученную смесь разделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя линейным градиентом метанола в системе ДХМ/MeOH/H₂O/Et₃N от 82:15:2:1 до 65:40:3:2. Фракции, содержащие незагрязненный продукт, объединили и упарили досуха. Остатки растворителей и влаги удаляли в вакууме масляного насоса над P₂O₅ на протяжении 24 ч. Полученное соединение расплывается на воздухе и должно храниться в герметичной емкости в отсутствии следов влаги до следующего использования. Выход: 6,27 г (67%) темно-синее твердое вещество. ¹H-ЯМР (DMCO-*d*₆, δ): 8,34 (т, *J* = 13,1 Гц, 2H, b-H, d-H), 8,24 (д, *J* = 7,6 Гц, 2H, 6-H, 6'-H), 7,80 (с, 2H, 4-H, 4'-H), 7,31 (д, *J* = 8,2 Гц, 2H, 7-H, 7'-H), 6,59 (т, *J* = 12,3 Гц, 1H, c-H), 6,29 (д, *J* = 13,9 Гц, 2H, a-H, e-H), 4,08 (т, *J* = 6,7 Гц, 4H, α-CH₂, α'-CH₂), 2,78 (кв, *J* = 7,2 Гц, 14,5H, Et₃N), 2,18 (т, *J* = 6,6 Гц, 4H, ε-CH₂, ε'-CH₂), 1,68 (м, 16H, 4×CH₃, β-CH₂, β'-CH₂), 1,54 (м, 4H, δ-CH₂, δ'-CH₂), 1,36 (м, 4H, γ-CH₂, γ'-CH₂), 1,05 (т, *J* = 7,2 Гц, 22H, Et₃N); ¹³C-ЯМР (DMCO-*d*₆, δ): 174,54, 172,97, 154,23, 145,05, 142,04, 140,51, 126,06, 125,96, 119,90, 110,21, 48,87, 45,38, 33,78, 27,06, 26,68, 25,65, 24,31, 9,03.



1-(6-((2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этил)амино)-6-оксоэтил)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(5-карбоксопентил)-3,3-диметил-5-сульфонатиндолин-2-илиден)пента-1,3-диен-1-ил)-3,3-диметил-3H-индол-1-илий-5-сульфонат калия (30)

Триэтиламмонийную соль сульфо-Су5 дикислоты **29** (1,0 мг, 1,0 ммоль) растворили в абс. ДМФА (25 мл). Раствор охладили на ледяной бане и прибавили триэтиламин (355 мкл, 2,5 ммоль) и РуВОР (600 мг, 1,1 ммоль). Перемешивали 20 мин, затем добавили 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **20** (200 мг, 1,1 ммоль). Реакционную смесь выдержали при перемешивании 1 ч, поднимая температуру до комнатной и вылили в этилацетат (250 мл). Осадок отфильтровали через хлопковый фильтр, промыли этилацетатом (250 мл), смыли чистым MeOH с фильтра и сконцентрировали в вакууме. Аддукт красителя с аминоазидом **20** 1:1 выделяли из смеси колоночной хроматографией на силикагеле,

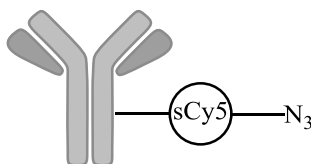
элюируя линейным градиентом метанола в системе: ДХМ/MeOH/H₂O/Et₃N от 87:10:2:1 до 56:40:3:1. Чистые фракции объединили, упарили и растворили в минимальном объеме дистиллированной воды. Для перевода триэтиламмониевой соли в калиевую, раствор пропустили через ионообменную колонну с катионитом Dowex 50WX в K⁺-форме, элюируя дистиллированной водой до обесцвечивания элюата. Продукт сконцентрировали в вакууме, упарили дважды из метанольного раствора и сушили в вакуум-эксикаторе над P₂O₅. Выход: 570 мг (61%) темно-синее твердое вещество. ¹H-ЯМР (DMCO-d₆, δ): 8,35 (т, J = 13,0 Гц, 2H), 7,80 (ушир. с, 2H), 7,79 (т, J = 5,5 Гц, 1H), 7,62 (м, 2H), 7,31 (м, 2H), 6,59 (т, J = 12,3 Гц, 1H), 6,29 (д, J = 13,7 Гц, 2H), 4,07 (м, 4H), 3,58-3,47 (м, 7H), 3,38-3,35 (м, 4H), 3,17-3,14 (м, 3H), 2,18 (т, J = 7,2 Гц, 2H), 2,04 (т, J = 7,3 Гц, 2H), 1,70-1,65 (м, 4H), 1,68 (с, 12H), 1,56-1,49 (м, 4H), 1,39-1,30 (м, 4H).



1-(6-((2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этил)амино)-6-оксоэтил)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(5-((E)-1-(6-((2,5-диоксопирролиди-1-ил)окси)-6-оксоэтил)-3,3-диметил-5-сульфонатиндолин-2-илиден)пента-1,3-диен-1-ил)-3,3-диметил-3H-индол-1-илий-5-сульфонат калия (31)

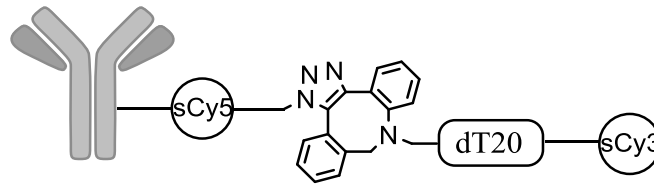
Сульфо-Су5 азидокислоту **30** (530 мг, 0,57 ммоль) растворили в абсолютном ДМСО (3 мл), добавили DIPEA (150 мкл, 0,85 ммоль) и TSTU (255 мг, 0,85 ммоль). Реакционную смесь перемешивали до полного растворения при комнатной температуре. Раствор профильтровали через хлопковый фильтр и осадили, добавив этилацетат (100 мл). Суспензию перемешивали в течение 30 мин, отфильтровали и промыли этилацетатом. Осадок растворили в абсолютном ДМСО (10 мл) и осадили еще раз этилацетатом (100 мл). Маточный раствор отделили декантированием, аморфный осадок кристаллизовали, перетирая с сухим ацетоном (100 мл). Продукт отфильтровали, промыли сухим ацетоном

(100 мл), н-гексаном (50 мл) и сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 в течение 24 ч. Выход: 562 мг (98%) темно-синий порошок. 1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 8,35 (т, $J = 13,1$ Гц, 2H), 7,82 (с, 2H), 7,80 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 7,65 (д, $J = 8,2$ Гц, 2H), 7,32 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H), 6,59 (т, $J = 12,3$ Гц, 1H), 6,30 (д, $J = 13,7$ Гц, 2H), 4,08 (с, br, 4H), 3,58-3,45 (м, 6H), 3,37 (м, 4H), 3,16 (кв, $J = 5,7$ Гц, 2H), 2,80 (с, 3H), 2,66 (т, $J = 7,1$ Гц, 2H), 2,04 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H), 1,73-1,23 (м, 11H), 1,68 (с, 16H); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6 , δ): 174,29, 173,00, 172,00, 170,23, 168,86, 154,23, 145,13, 142,01, 140,50, 126,11, 125,97, 119,92, 110,17, 103,54, 103,46, 69,60, 69,54, 69,21, 69,15, 49,98, 48,87, 43,37, 38,39, 35,01, 33,46, 29,98, 27,07, 26,65, 26,36, 25,70, 25,60, 25,42, 25,21, 25,12, 24,86, 24,19, 23,93.



Мечение моноклонального антитела – реакция контролируемого азидирования

Реакцию проводили в сосуде Эппендорфа объемом 0,5 мл. К раствору моноклонального антитела (1 мг, 6,25 нмоль) в PBS (152 мкл, pH 7.4) добавили 10 мМ свежеприготовленный раствор кросс-сшивающего реагента **31** (1,25 мкл, 10мМ) в свежеперегнанном и сухом ДМСО. Раствор перемешали и выдержали при комнатной температуре 6 ч. Реакционную смесь осаждали добавлением равного объема 4 М $(NH_4)_2SO_4$ (160 мкл), выдержали при $+4^\circ C$ 20 мин, центрифугировали 5 мин при 12000 об/мин. Супернатант отбросили, осадок растворили в 200 мкл PBS (pH 7.4) и снова осаждали насыщенным водным раствором $(NH_4)_2SO_4$ (200 мкл), охлаждали 20 мин, центрифугировали, декантировали. Осадок растворили в 1,25 мл PBS, нанесли на NAP-10, уравновешенную в PBS, добавили 0,25 мл буфера и затем элюировали 1,5 мл. Собрали фракцию белка в объеме 1,5 мл, небольшое количество свободного красителя задержалось на колонке. Элюат белка сконцентрировали ультрацентрифугированием на мембране Corning Spin-X UF 500, 30K MWCO. Для измерения количества полученного конъюгата сконцентрированный осадок иммуноглобулина растворили в PBS (200 мкл), измерили оптическую плотность на 280 и 650 нм. Концентрация антитела составила 4,4 мг/мл, а масса - 0,88 мг, выход составил 88%. Установленная степень модификации: 0,6 молекулы красителя на 1 молекулу антитела, соотношение определяли спектрофотометрически.



Конъюгация иммуноглобулина с олигонуклеотидом (SPAAC).

Олигонуклеотид 5'-Амино-dT20-3'-sCy3 (3,75 нмоль) растворили в 0,2 М ТЕАА буфере рН 8.25 (20 мкл). Добавили к олигонуклеотиду 8-кратный избыток ADIBO NHS эфира **28** в ДМСО (30 нмоль, 6,5 мкл). Смесь перемешали и выдержали при комнатной температуре в течение 2 ч, осаждали ацетоном с перхлоратом лития трижды, промывали 96% этанолом. Растворили осадок в Трис-боратном буфере (30 мкл). Конверсию оценивали по ВЭЖХ на обращенной С-18 фазе. Полученный олигонуклеотид с циклоалкином на 5'-конце (25 мкл) прибавили к модифицированному антителу (100 мкг, 0,625 нМоль) в Трис-боратном буфере (25 мкл) (избыток олигонуклеотида составил 5-кратный по отношению к антителу). Смесь в сосуде Эппендорфа выдержали при 37°C 4 ч. Реакционную смесь осаждали 4М (NH₄)₂SO₄ (60 мкл) центрифугировали и отбросили супернатант. Растворили осадок в Трис-боратном буфере (100 мкл) и сконцентрировали на мембране Corning Spin-X UF 500; 30К MWCO, отделив непрореагировавший олигонуклеотид от конъюгата олигонуклеотида. Конъюгат иммуноглобулина с антителом растворили в 50 мкл Трис-боратном буфере. Хранили в холодильнике раствор при +4 °С.

Выводы

1. На основе (*R*)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диола получены реагенты для введения пиреновых флуорофоров и тушителя Dabcyl в ДНК-зонды типа «молекулярный маяк». Для эксимерных зондов показана возможность варьирования λ_{\max} (475–510 нм), Стоксова сдвига (125–160 нм) и интенсивности эксимерной полосы подбором мономерного состава пиреновой метки.
2. Предложена донорно-акцепторная пара для олигонуклеотидных зондов - пиреновый эксимер/Cy3. Подобрано оптимальное расположение донора и акцептора для максимальной эффективности переноса энергии при гибридизации двух зондов на комплементарной матрице.
3. Получена библиотека азидопроизводных на основе флуоресцентных красителей, биотина и холестерина. Определены оптимальные условия твердофазной Cu(I)AAC-модификации олигонуклеотидов с применением данных реагентов.
4. В качестве нового флуоресцентного маркера зондов для «голубого» канала детекции в кПЦР предложен 1-фенилэтинилпирен (PEPy) как альтернатива кумариновым флуорофорам. В TaqMan-зондах PEPy показал увеличение флуоресцентного сигнала в 2 раза по сравнению с красителем AMCA и снижение значения порогового цикла (C_t) на 2,5-6 ед.
5. Синтезирован реагент на основе красителя Cy5 для контролируемого введения азидогрупп в белки. Разработан метод SPAAC-конъюгации олигонуклеотидов с иммуноглобулинами с простой и количественной спектрофотометрической оценкой соотношения белок/ДНК.

Благодарности

В первую очередь автор выражает признательность А.А. Формановскому за руководство диссертационной работой, а также В.А. Коршуну и Т.С. Зацепину за постоянное участие и помощь в работе.

Автор благодарен всем сотрудникам лаборатории органического синтеза и группы биоконъюгации ИБХ РАН, в особенности И.В. Михуре за помощь в подготовке рукописи диссертации, А.В. Устинову и И.А. Прохоренко за ценные консультации, Г.В. Проскуруину и Я.Ю. Берлиной за помощь в экспериментальной работе. Кроме того, автор благодарит за помощь коллег из других организаций: Т.Н. Власик (РКНПК Минздрава России) и Ю.С. Скоблова (ИБХ РАН) за предоставление иммуноглобулина G для его конъюгации с олигонуклеотидами, В.М. Фарзан (Сколковский институт науки и технологий) за синтез олигонуклеотидов и аналитические данные, О.А. Веселову (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) – за проведение ПЦР в реальном времени, Е.В. Хайдукова (ИПЛИТ РАН) за помощь в определении времен жизни флуоресценции, А.В. Головина (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ) за молекулярное моделирование пиреновых флуорофоров в составе олигонуклеотидов. Автор безгранично благодарен К.Е. Мироновой и А.И. Апаринной, а также Л.В. Апаринной и О.И. Апарину за вдохновение и поддержку.

Список сокращений

- ВЭЖХ (HPLC)** – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДИПЭА (DIPEA)** – диизопропилэтиламин
- ДИЭА (DIEA)** – диизопропиламин
- ДМСО** – диметилсульфоксид
- Дмт (Dmt)** – 4,4'-диметокситритил
- ДМФА** – диметилформаид
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДХМ** – дихлорметан (метиленхлорид)
- ДЦК (DCC)** – дициклогексилкарбодиимид
- ДЦМ (DCU)** – дициклогексилмочевина
- кПЦР (qPCR)** – ПЦР в реальном времени
- ОДН (ODN)** – олигодезоксинуклеотиды
- ПАУ** – полициклические ароматические углеводороды
- ПЦР (PCR)** – полимеразная цепная реакция
- РНК** – рибонуклеиновая кислота
- ТГФ** – тетрагидрофуран
- ТО** – тиазоловый оранжевый
- Трис** – трис(гидроксиметил)аминометана
- ТСХ** – тонкослойная хроматография
- УФ** – ультрафиолетовый
- ЭДТА** - этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЯМР** – ядерный магнитный резонанс
- ADIBO** – азибензоциклооктин
- bdNA** – разветвленные ДНК
- BMS** – комплекс борана с диметилсульфидом
- 13C-DEPT** – неискаженное усиление переноса поляризации
- COSY** – корреляционная спектроскопия
- Cu(I)AAC** – медь(I)-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение
- DMAP** – *N,N*-диметиламинопиридин
- DSC** – *N,N'*-дисукцинимидкарбонат
- DTT** – дитиотриэтол
- ESI** – ионизация электрораспылением
- FISH** – флуоресцентная гибридизация *in situ*

FRET – резонансный перенос энергии Фёрстера
HCR – гибридизационная цепная реакция
HMBC – гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия
HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия
LNA – замкнутые нуклеиновые кислоты
MGB – лиганд связывающийся с малой бороздкой
NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NHS – *N*-гидроксисукцинимид
NOESY – ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера
ODF – олигодезоксифлуорофоры
PBS – натрий-фосфатный буфер
PEPy – 1-фенилэтинилпирен
PLA – анализ сближенного легирования
PNA – пептидно-нуклеиновые кислоты
Py – пиридин
PyBOP – бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат
RCA – амплификация по типу катящегося кольца
ROESY – спектроскопия эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат
SBR – отношение уровня полезный сигнал/фон
SFRET – спин-запрещенный резонансный перенос энергии
SNP – однонуклеотидный полиморфизм
SPAAC – азид-алкиновое циклоприсоединение промотируемое напряжением в цикле
STICs – последовательно связанные и переплетенные комплексы
TBTA – трис(1-бензил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метиламин
TCEP – трис(карбоксиэтил)фосфин
THPTA – трис(1-(3-гидроксипропил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метиламин
TSTU – *N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(*N*-сукцинимидил)уроний тетрафторборат
TEAA – триэтиламмоний ацетатный буфер

Список используемой литературы

- [1] Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 1948–1998.
- [2] Wang, R.E.; Zhang, Y.; Cai, J.; Cai, W.; Gao, T. Aptamer-Based Fluorescent Biosensors. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, *18*, 4175–4184.
- [3] Juskowiak, B. Nucleic Acid-Based Fluorescent Probes and Their Analytical Potential. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *399*, 3157–3176.
- [4] Makino, K.; Murakami, A.; Nagahara, S.; Nakatsuji, Y.; Takeuchi, T. A Study on Spin-Labelled Oligonucleotide Synthesis and Its Electron Spin Resonance Behavior in Solution. *Free Radic. Res. Commun.*, **1989**, *6*, 311–316.
- [5] Spaltenstein, A.; Robinson, B.H.; Hopkins, P.B. A Rigid and Nonperturbing Probe for Duplex DNA Motion. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1299–1301.
- [6] Delanoue, R.; Herpers, B.; Soetaert, J.; Davis, I.; Rabouille, C. Drosophila Squid/hnRNP Helps Dynein Switch from a Gurken mRNA Transport Motor to an Ultrastructural Static Anchor in Sponge Bodies. *Dev. Cell*, **2007**, *13*, 523–538.
- [7] Herpers, B.; Rabouille, C. mRNA Localization and ER-Based Protein Sorting Mechanisms Dictate the Use of Transitional Endoplasmic Reticulum-Golgi Units Involved in Gurken Transport in Drosophila Oocytes. *Mol. Biol. Cell*, **2004**, *15*, 5306–5317.
- [8] Nakayama, M.; Ihara, T.; Nakano, K.; Maeda, M. DNA Sensors Using a Ferrocene-Oligonucleotide Conjugate. *Talanta*, **2002**, *56*, 857–866.
- [9] Iyer, A.K.; He, J. Radiolabeled Oligonucleotides for Antisense Imaging. *Curr. Org. Synth.*, **2011**, *8*, 604–614.
- [10] Ballal, R.; Cheema, A.; Ahmad, W.; Rosen, E.M.; Saha, T. Fluorescent Oligonucleotides Can Serve as Suitable Alternatives to Radiolabeled Oligonucleotides. *J. Biomol. Tech.*, **2009**, *20*, 190–194.
- [11] Demidov, V. V; Frank-Kamenetskii, M.D. Two Sides of the Coin: Affinity and Specificity of Nucleic Acid Interactions. *Trends Biochem. Sci.*, **2004**, *29*, 62–71.
- [12] Mathews, D.H.; Burkard, M.E.; Freier, S.M.; Wyatt, J.R.; Turner, D.H. Predicting Oligonucleotide Affinity to Nucleic Acid Targets. *RNA*, **1999**, *5*, 1458–1469.
- [13] Yilmaz, L.S.; Noguera, D.R. Mechanistic Approach to the Problem of Hybridization Efficiency in Fluorescent In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *70*, 7126–7139.
- [14] Lomakin, A.; Frank-Kamenetskii, M.D. A Theoretical Analysis of Specificity of Nucleic Acid Interactions with Oligonucleotides and Peptide Nucleic Acids (PNAs). *J. Mol. Biol.*, **1998**, *276*, 57–70.
- [15] Mathews, D.H.; Turner, D.H. Dynalign: An Algorithm for Finding the Secondary Structure Common to Two RNA Sequences. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *317*, 191–203.
- [16] Zuker, M.; Mathews, D.H.; Turner, D.H. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*; Springer Netherlands: Dordrecht, **1999**; pp. 11–43.
- [17] Zuker, M. Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3406–3415.

- [18] Knudsen, B.; Hein, J. Pfold: RNA Secondary Structure Prediction Using Stochastic Context-Free Grammars. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3423–3428.
- [19] Ding, Y.; Lawrence, C.E. A Statistical Sampling Algorithm for RNA Secondary Structure Prediction. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 7280–7301.
- [20] Nitin, N.; Santangelo, P.J.; Kim, G.; Nie, S.; Bao, G. Peptide-Linked Molecular Beacons for Efficient Delivery and Rapid mRNA Detection in Living Cells. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, e58.
- [21] Chenna, R.; Sugawara, H.; Koike, T.; Lopez, R.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G.; Thompson, J.D. Multiple Sequence Alignment with the Clustal Series of Programs. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3497–3500.
- [22] Markham, N.R.; Zuker, M. DINAMelt Web Server for Nucleic Acid Melting Prediction. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, W577–W581.
- [23] Dimitrov, R.A.; Zuker, M. Prediction of Hybridization and Melting for Double-Stranded Nucleic Acids. *Biophys. J.*, **2004**, *87*, 215–226.
- [24] SantaLucia, J. A Unified View of Polymer, Dumbbell, and Oligonucleotide DNA Nearest-Neighbor Thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 1460–1465.
- [25] Peyret, N.; Seneviratne, P.A.; Allawi, H.T.; SantaLucia, J. Nearest-Neighbor Thermodynamics and NMR of DNA Sequences with Internal A.A, C.C, G.G, and T.T Mismatches. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 3468–3477.
- [26] Ludwig, W.; Strunk, O.; Westram, R.; Richter, L.; Meier, H.; Yadhukumar; Buchner, A.; Lai, T.; Steppi, S.; Jobb, G.; Förster, W.; Brettske, I.; Gerber, S.; Ginhart, A.W.; Gross, O.; Grumann, S.; Hermann, S.; Jost, R.; König, A.; Liss, T.; Lüssmann, R.; May, M.; Nonhoff, B.; Reichel, B.; Strehlow, R.; Stamatakis, A.; Stuckmann, N.; Vilbig, A.; Lenke, M.; Ludwig, T.; Bode, A.; Schleifer, K.-H. ARB: A Software Environment for Sequence Data. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 1363–1371.
- [27] Ashelford, K.E.; Weightman, A.J.; Fry, J.C. PRIMROSE: A Computer Program for Generating and Estimating the Phylogenetic Range of 16S rRNA Oligonucleotide Probes and Primers in Conjunction with the RDP-II Database. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 3481–3489.
- [28] Loy, A.; Horn, M.; Wagner, M. probeBase: An Online Resource for rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 514–516.
- [29] Loy, A.; Maixner, F.; Wagner, M.; Horn, M. probeBase--an Online Resource for rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes: New Features 2007. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, D800–D804.
- [30] Greuter, D.; Loy, A.; Horn, M.; Rattei, T. probeBase—an Online Resource for rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Primers: New Features 2016. *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*, D586–D589.
- [31] Toribio, A.L.; Alako, B.; Amid, C.; Cerdeño-Tarrága, A.; Clarke, L.; Cleland, I.; Fairley, S.; Gibson, R.; Goodgame, N.; Ten Hoopen, P.; Jayathilaka, S.; Kay, S.; Leinonen, R.; Liu, X.; Martínez-Villacorta, J.; Pakseresht, N.; Rajan, J.; Reddy, K.; Rosello, M.; Silvester, N.; Smirnov, D.; Vaughan, D.; Zalunin, V.; Cochrane, G. European Nucleotide Archive in 2016. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, D32–D36.
- [32] Wuyts, J.; Perrière, G.; Van De Peer, Y. The European Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, D101–D103.
- [33] Benson, D.A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.;

- Sayers, E.W. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, **2013**, *41*, D36–D42.
- [34] Cole, J.R.; Wang, Q.; Fish, J.A.; Chai, B.; McGarrell, D.M.; Sun, Y.; Brown, C.T.; Porras-Alfaro, A.; Kuske, C.R.; Tiedje, J.M. Ribosomal Database Project: Data and Tools for High Throughput rRNA Analysis. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, *42*, D633–D642.
- [35] Cole, J.R.; Chai, B.; Farris, R.J.; Wang, Q.; Kulam, S.A.; McGarrell, D.M.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and Tools for High-Throughput rRNA Analysis. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, D294–D296.
- [36] Szymanski, M.; Barciszewska, M.Z.; Erdmann, V.A.; Barciszewski, J. 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 176–178.
- [37] Worden, A.Z.; Chisholm, S.W.; Binder, B.J. In Situ Hybridization of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Marine Cyanobacteria) Spp. with rRNA-Targeted Peptide Nucleic Acid Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, *66*, 284–289.
- [38] Hyrup, B.; Nielsen, P.E. Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications. *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, *4*, 5–23.
- [39] Kubota, K.; Ohashi, A.; Imachi, H.; Harada, H. Improved in Situ Hybridization Efficiency with Locked-Nucleic-Acid-Incorporated DNA Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2006**, *72*, 5311–5317.
- [40] Singh, S.K.; Koshkin, A.A.; Wengel, J.; Nielsen, P.; Wang, J.; Wagner, R.W.; Matteucci, M.D. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis and High-Affinity Nucleic Acid Recognition. *Chem. Commun.*, **1998**, *22*, 455–456.
- [41] Petersen, M.; Wengel, J. LNA: A Versatile Tool for Therapeutics and Genomics. *Trends Biotechnol.*, **2003**, *21*, 74–81.
- [42] Kawasaki, A.M.; Casper, M.D.; Freier, S.M.; Lesnik, E.A.; Zounes, M.C.; Cummins, L.L.; Gonzalez, C.; Cook, P.D. Uniformly Modified 2'-deoxy-2'-fluoro Phosphorothioate Oligonucleotides as Nuclease-Resistant Antisense Compounds with High Affinity and Specificity for RNA Targets. *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 831–841.
- [43] Singh, Y.; Murat, P.; Defrancq, E. Recent Developments in Oligonucleotide Conjugation. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 2054–2070.
- [44] Molenaar, C.; Marras, S.A.; Slats, J.C.; Truffert, J.C.; Lemaître, M.; Raap, A.K.; Dirks, R.W.; Tanke, H.J. Linear 2' O-Methyl RNA Probes for the Visualization of RNA in Living Cells. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, e89.
- [45] Altmann, K.-H.; Dean, N.M.; Fabbro, D.; Freier, S.M.; Geiger, T.; Haner, R.; Husken, D.; Martin, P.; Monia, B.P.; Muller, M.; Natt, F.; Nicklin, P.; Phillips, J.; Pieves, U.; Sasmor, H.; Moser, H.E. Second Generation of Antisense Oligonucleotides: From Nuclease Resistance to Biological Efficacy in Animals. *Chim. Int. J. Chem.*, **1996**, *50*, 168–176.
- [46] Altmann, K.-H.; Fabbro, D.; Dean, N.M.; Geiger, T.; Monia, B.P.; Müllert, M.; Nicklin, P. Second-Generation Antisense Oligonucleotides: Structure—activity Relationships and the Design of Improved Signal-Transduction Inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.*, **1996**, *24*, 630–637.
- [47] Ruffner, D.E.; Uhlenbeck, O.C. Thiophosphate Interference Experiments Locate Phosphates Important for the Hammerhead RNA Self-Cleavage Reaction. *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 6025–6029.
- [48] Thaler, D.S.; Liu, S.; Tomblin, G. Extending the Chemistry That Supports Genetic Information Transfer in Vivo: Phosphorothioate DNA, Phosphorothioate RNA, 2'-O-Methyl RNA, and Methylphosphonate DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**, *93*,

1352–1356.

- [49] Summerton, J.; Weller, D. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1997**, *7*, 187–195.
- [50] Silverman, A.P.; Kool, E.T. Oligonucleotide Probes for RNA-Targeted Fluorescence in Situ Hybridization. *Adv. Clin. Chem.*, **2007**, *43*, 79–115.
- [51] Carrasco, N.; Ginsburg, D.; Du, Q.; Huang, Z. Synthesis of Selenium-Derivatized Nucleosides and Oligonucleotides for X-Ray Crystallography. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2001**, *20*, 1723–1734.
- [52] Marras, S.A.E.; Kramer, F.R.; Tyagi, S. Efficiencies of Fluorescence Resonance Energy Transfer and Contact-Mediated Quenching in Oligonucleotide Probes. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, e122.
- [53] Carlson, C.S.; Emerson, R.O.; Sherwood, A.M.; Desmarais, C.; Chung, M.-W.; Parsons, J.M.; Steen, M.S.; LaMadrid-Herrmannsfeldt, M.A.; Williamson, D.W.; Livingston, R.J.; Wu, D.; Wood, B.L.; Rieder, M.J.; Robins, H. Using Synthetic Templates to Design an Unbiased Multiplex PCR Assay. *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 2680.
- [54] Lee, J.H.; Kim, J.A.; Jeong, S.; Rhee, W.J. Simultaneous and Multiplexed Detection of Exosome microRNAs Using Molecular Beacons. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, *86*, 202–210.
- [55] Anderson, R. Multiplex Fluorescence in Situ Hybridization (M-FISH). In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; **2010**; Vol. 659, pp. 83–97.
- [56] Lakowicz, J.R. Energy Transfer. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US: Boston, MA, **1999**; pp. 367–394.
- [57] Ronald M. Cook, Matt Lyttle, D.D. Dark Quenchers For Donor-Acceptor Energy Transfer. US 20110092679 A1, **2010**.
- [58] Peng, X.; Chen, H.; Draney, D.R.; Volcheck, W.; Schutz-Geschwender, A.; Olive, D.M. A Nonfluorescent, Broad-Range Quencher Dye for Förster Resonance Energy Transfer Assays. *Anal. Biochem.*, **2009**, *388*, 220–228.
- [59] Marras, S.A.E. *Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes*; Humana Press: New Jersey, **2006**; Vol. 335, pp. 3–16.
- [60] Levitus, M.; Ranjit, S. Cyanine Dyes in Biophysical Research: The Photophysics of Polymethine Fluorescent Dyes in Biomolecular Environments. *Q. Rev. Biophys.*, **2011**, *44*, 123–151.
- [61] Birks, J.B. Excimers. *Reports Prog. Phys.*, **1975**, *38*, 903–974.
- [62] Winnik, F.M. Photophysics of Preassociated Pyrenes in Aqueous Polymer Solutions and in Other Organized Media. *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 587–614.
- [63] Balakin, K.V.; Korshun, V.A.; Mikhalev, I.I.; Maleev, G.V.; Malakhov, A.D.; Prokhorenko, I.A.; Berlin, Y.A. Conjugates of Oligonucleotides with Polyaromatic Fluorophores as Promising DNA Probes. *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, *13*, 771–778.
- [64] Wu, C.; Wang, C.; Yan, L.; Yang, C.J. Pyrene Excimer Nucleic Acid Probes for Biomolecule Signaling. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2009**, *5*, 495–504.
- [65] Wang, C.; Wu, C.; Chen, Y.; Song, Y.; Tan, W.; James Yang, C. Pyrene Excimer for DNA Sensors. *Curr. Org. Chem.*, **2011**, *15*, 465–476.
- [66] Østergaard, M.E.; Hrdlicka, P.J. Pyrene-Functionalized Oligonucleotides and Locked Nucleic Acids (LNAs): Tools for Fundamental Research, Diagnostics, and

- Nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5771–5788.
- [67] Teo, Y.N.; Kool, E.T. DNA-Multichromophore Systems. *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 4221–4245.
- [68] Zimmermann, J.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. DNA Polynucleotide Probes Generated from Representatives of the Genus *Acinetobacter* and Their Application in Fluorescence in Situ Hybridization of Environmental Samples. *Syst. Appl. Microbiol.*, **2001**, *24*, 238–244.
- [69] DeLong, E.F.; Taylor, L.T.; Marsh, T.L.; Preston, C.M. Visualization and Enumeration of Marine Planktonic Archaea and Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent in Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, *65*, 5554–5563.
- [70] Trebesius, K.; Amann, R.; Ludwig, W.; Mühlegger, K.; Schleifer, K.H. Identification of Whole Fixed Bacterial Cells with Nonradioactive 23S rRNA-Targeted Polynucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994**, *60*, 3228–3235.
- [71] Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.*, **1995**, *59*, 143–169.
- [72] Amann, R.; Fuchs, B.M.; Behrens, S. The Identification of Microorganisms by Fluorescence in Situ Hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2001**, *12*, 231–236.
- [73] Morris, R.M.; Rappé, M.S.; Connon, S.A.; Vergin, K.L.; Siebold, W.A.; Carlson, C.A.; Giovannoni, S.J.; Morris, R.M.; Rappé, M.S.; Vergin, K.L.; Siebold, W.A.; Carlson, C.A.; Giovannoni, S.J. SAR11 Clade Dominates Ocean Surface Bacterioplankton Communities. *Nature*, **2002**, *420*, 806–810.
- [74] Pernthaler, A.; Preston, C.M.; Pernthaler, J.; DeLong, E.F.; Amann, R. Comparison of Fluorescently Labeled Oligonucleotide and Polynucleotide Probes for the Detection of Pelagic Marine Bacteria and Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*, 661–667.
- [75] Wessendorf, M.W.; Brelje, T.C. Which Fluorophore Is Brightest? A Comparison of the Staining Obtained Using Fluorescein, Tetramethylrhodamine, Lissamine Rhodamine, Texas Red, and Cyanine 3.18. *Histochemistry*, **1992**, *98*, 81–85.
- [76] Glöckner, F.O.; Amann, R.; Alfreider, A.; Pernthaler, J.; Psenner, R.; Trebesius, K.; Schleifer, K.-H.; Oliver, F.; Rudolf, G.; Albin, A.; Pernthaler, J.; Psenner, R.; Trebesius, K.; Schleifer, K.-H.; Glöckner, F.O.; Amann, R.; Alfreider, A.; Pernthaler, J.; Psenner, R.; Trebesius, K.; Schleifer, K.-H. An In Situ Hybridization Protocol for Detection and Identification of Planktonic Bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **1996**, *19*, 403–406.
- [77] Southwick, P.L.; Ernst, L.A.; Tauriello, E.W.; Parker, S.R.; Mujumdar, R.B.; Mujumdar, S.R.; Clever, H.A.; Waggoner, A.S. Cyanine Dye Labeling Reagents—carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters. *Cytometry*, **1990**, *11*, 418–430.
- [78] Langer-Safer, P.R.; Levine, M.; Ward, D.C. Immunological Method for Mapping Genes on *Drosophila* Polytene Chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1982**, *79*, 4381–4385.
- [79] Zwirgmaier, K.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. Recognition of Individual Genes in a Single Bacterial Cell by Fluorescence in Situ Hybridization--RING-FISH. *Mol. Microbiol.*, **2004**, *51*, 89–96.
- [80] Chen, T.R. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH): Detection of Biotin- and Digoxigenin-Labeled Signals on Chromosomes. *J. Tissue Cult. Methods*, **1994**, *16*, 39–47.
- [81] Pernthaler, A.; Amann, R. Simultaneous Fluorescence in Situ Hybridization of mRNA and

- rRNA in Environmental Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *70*, 5426–5433.
- [82] Schönhuber, W.; Fuchs, B.; Juretschko, S.; Amann, R. Improved Sensitivity of Whole-Cell Hybridization by the Combination of Horseradish Peroxidase-Labeled Oligonucleotides and Tyramide Signal Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1997**, *63*, 3268–3273.
- [83] Amann, R.I.; Zarda, B.; Stahl, D.A.; Schleifer, K.H. Identification of Individual Prokaryotic Cells by Using Enzyme-Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1992**, *58*, 3007–3011.
- [84] van Gijlswijk, R.P.; van de Corput, M.P.; Bezrookove, V.; Wiegant, J.; Tanke, H.J.; Raap, A.K. Synthesis and Purification of Horseradish Peroxidase-Labeled Oligonucleotides for Tyramide-Based Fluorescence in Situ Hybridization. *Histochem. Cell Biol.*, **2000**, *113*, 175–180.
- [85] Dijk, J.A.; Breugelmans, P.; Philips, J.; Haest, P.J.; Smolders, E.; Springael, D. Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescent in Situ Hybridization (CARD-FISH) Detection of *Dehalococcoides*. *J. Microbiol. Methods*, **2008**, *73*, 142–147.
- [86] Gijlswijk, R.P.M. van; Zijlmans, H.J.M.A.A.; Wiegant, J.; Bobrow, M.N.; Erickson, T.J.; Adler, K.E.; Tanke, H.J.; Raap, A.K. Fluorochrome-Labeled Tyramides: Use in Immunocytochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*, **1997**, *45*, 375–382.
- [87] Pernthaler, A.; Pernthaler, J.; Amann, R. Fluorescence in Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*, 3094–3101.
- [88] Maruyama, F.; Kenzaka, T.; Yamaguchi, N.; Tani, K.; Nasu, M. Visualization and Enumeration of Bacteria Carrying a Specific Gene Sequence by In Situ Rolling Circle Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, *71*, 7933–7940.
- [89] Smolina, I.; Lee, C.; Frank-Kamenetskii, M. Detection of Low-Copy-Number Genomic DNA Sequences in Individual Bacterial Cells by Using Peptide Nucleic Acid-Assisted Rolling-Circle Amplification and Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, *73*, 2324–2328.
- [90] Collins, M. A Branched DNA Signal Amplification Assay for Quantification of Nucleic Acid Targets below 100 Molecules/ml. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 2979–2984.
- [91] Kern, D.; Collins, M.; Fultz, T.; Detmer, J.; Hamren, S.; Peterkin, J.J.; Sheridan, P.; Urdea, M.; White, R.; Yeghiazarian, T.; Todd, J. An Enhanced-Sensitivity Branched-DNA Assay for Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *J. Clin. Microbiol.*, **1996**, *34*, 3196–3202.
- [92] Player, A.N.; Shen, L.-P.; Kenny, D.; Antao, V.P.; Kolberg, J.A. Single-Copy Gene Detection Using Branched DNA (bDNA) In Situ Hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*, **2001**, *49*, 603–611.
- [93] Hashem Akhavan-Tafti, Zahra Arghavani, R.D. Compounds, Compositions and Methods for Generating Chemiluminescence with Phosphatase Enzymes. WO 1997026245 A1, **1997**.
- [94] Akhavan-Tafti, H.; Reddy, L. V; Siripurapu, S.; Schoenfelner, B.A.; Handley, R.S.; Schaap, A.P. Chemiluminescent Detection of DNA in Low- and Medium-Density Arrays. *Clin. Chem.*, **1998**, *44*, 2065–2066.
- [95] Battich, N.; Stoeger, T.; Pelkmans, L. Image-Based Transcriptomics in Thousands of Single Human Cells at Single-Molecule Resolution. *Nat. Methods*, **2013**, *10*, 1127–1133.

- [96] Sinnamon, J.R.; Czapinski, K. RNA Detection in Situ with FISH-STICs. *RNA*, **2014**, *20*, 260–266.
- [97] Dirks, R.M.; Pierce, N.A. From The Cover: Triggered Amplification by Hybridization Chain Reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, *101*, 15275–15278.
- [98] Evanko, D. Hybridization Chain Reaction. *Nat. Methods*, **2004**, *1*, 186–187.
- [99] Huang, J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Yang, X.; Yang, C.J.; Wang, K.; Tan, W. Pyrene-Excimer Probes Based on the Hybridization Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Fluids. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2011**, *50*, 401–404.
- [100] Yang, L.; Liu, C.; Ren, W.; Li, Z. Graphene Surface-Anchored Fluorescence Sensor for Sensitive Detection of MicroRNA Coupled with Enzyme-Free Signal Amplification of Hybridization Chain Reaction. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, *4*, 6450–6453.
- [101] Choi, H.M.T.; Beck, V.A.; Pierce, N.A. Next-Generation *in Situ* Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. *ACS Nano*, **2014**, *8*, 4284–4294.
- [102] Choi, J.; Routenberg Love, K.; Gong, Y.; Gierahn, T.M.; Love, J.C. Immuno-Hybridization Chain Reaction for Enhancing Detection of Individual Cytokine-Secreting Human Peripheral Mononuclear Cells. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 6890–6895.
- [103] Huang, J.; Wang, H.; Yang, X.; Quan, K.; Yang, Y.; Ying, L.; Xie, N.; Ou, M.; Wang, K. Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Hybridization Chain Reaction for *in Situ* Visualization of Tumor-Related mRNA. *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 3829–3835.
- [104] Cheglakov, Z.; Cronin, T.M.; He, C.; Weizmann, Y. Live Cell MicroRNA Imaging Using Cascade Hybridization Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 6116–6119.
- [105] Wu, Z.; Liu, G.-Q.; Yang, X.-L.; Jiang, J.-H. Electrostatic Nucleic Acid Nanoassembly Enables Hybridization Chain Reaction in Living Cells for Ultrasensitive mRNA Imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 6829–6836.
- [106] Xuan, F.; Hsing, I.-M. Triggering Hairpin-Free Chain-Branching Growth of Fluorescent DNA Dendrimers for Nonlinear Hybridization Chain Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 9810–9813.
- [107] Xu, Y.; Zheng, Z. Direct RNA Detection without Nucleic Acid Purification and PCR: Combining Sandwich Hybridization with Signal Amplification Based on Branched Hybridization Chain Reaction. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, *79*, 593–599.
- [108] Bi, S.; Chen, M.; Jia, X.; Dong, Y.; Wang, Z. Hyperbranched Hybridization Chain Reaction for Triggered Signal Amplification and Concatenated Logic Circuits. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2015**, *54*, 8144–8148.
- [109] Yu, X.; Zhang, Z.-L.; Zheng, S.-Y. Highly Sensitive DNA Detection Using Cascade Amplification Strategy Based on Hybridization Chain Reaction and Enzyme-Induced Metallization. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, *66*, 520–526.
- [110] Niu, S.; Jiang, Y.; Zhang, S.; Spakowitz, A.J.; Wang, Z.G.; Pierce, N.A.; Seeman, N.C.; Kotov, N.A. Fluorescence Detection for DNA Using Hybridization Chain Reaction with Enzyme-Amplification. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3089–3091.
- [111] Lu, S.; Hu, T.; Wang, S.; Sun, J.; Yang, X. Ultra-Sensitive Colorimetric Assay System Based on the Hybridization Chain Reaction-Triggered Enzyme Cascade Amplification. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*, 167–175.
- [112] Bi, S.; Yue, S.; Zhang, S. Hybridization Chain Reaction: A Versatile Molecular Tool for Biosensing, Bioimaging, and Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 4281–4298.

- [113] Ortiz, E.; Estrada, G.; Lizardi, P.M. PNA Molecular Beacons for Rapid Detection of PCR Amplicons. *Mol. Cell. Probes*, **1998**, *12*, 219–226.
- [114] Li, J.J.; Chu, Y.; Lee, B.Y.-H.; Xie, X.S. Enzymatic Signal Amplification of Molecular Beacons for Sensitive DNA Detection. *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36*, e36.
- [115] Li, D.I.; Song, S.; Fan, C. Target-Responsive Structural Switching for Nucleic Acid-Based Sensors. *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43*, 631–641.
- [116] Giesendorf, B.A.J.; Vet, J.A.M.; Tyagi, S.; Mensink, E.J.M.G.; Trijbels, F.J.M.; Blom, H.J. Molecular Beacons: A New Approach for Semiautomated Mutation Analysis. *Clin. Chem.*, **1998**, *44*, 482–486.
- [117] Tsourkas, A.; Behlke, M.A.; Rose, S.D.; Bao, G. Hybridization Kinetics and Thermodynamics of Molecular Beacons. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 1319–1330.
- [118] Tyagi, S.; Marras, S.A.E.; Kramer, F.R. Wavelength-Shifting Molecular Beacons. *Nat. Biotechnol.*, **2000**, *18*, 1191–1196.
- [119] Santangelo, P.J.; Nix, B.; Tsourkas, A.; Bao, G. Dual FRET Molecular Beacons for mRNA Detection in Living Cells. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, e57.
- [120] Conlon, P.; Yang, C.J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Martinez, K.; Kim, Y.; Stevens, N.; Marti, A.A.; Jockusch, S.; Turro, N.J.; Tan, W. Pyrene Excimer Signaling Molecular Beacons for Probing Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 336–342.
- [121] Yang, C.J.; Pinto, M.; Schanze, K.; Tan, W. Direct Synthesis of an Oligonucleotide-Poly(phenylene Ethynylene) Conjugate with a Precise One-to-One Molecular Ratio. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2005**, *44*, 2572–2576.
- [122] Rosi, N.L.; Giljohann, D.A.; Thaxton, C.S.; Lytton-Jean, A.K.R.; Han, M.S.; Mirkin, C.A. Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science (80-.)*, **2006**, *312*, 1027–1030.
- [123] Cady, N.C. Quantum Dot Molecular Beacons for DNA Detection. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; **2009**; Vol. 544, pp. 367–379.
- [124] Yang, C.J.; Medley, C.D.; Tan, W. Monitoring Nucleic Acids Using Molecular Beacons. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2010**, *6*, 445–452.
- [125] Yang, C.J.; Lin, H.; Tan, W. Molecular Assembly of Superquenchers in Signaling Molecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12772–12773.
- [126] 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. Two-Dye and One- or Two-Quencher DNA Probes for Real-Time PCR Assay: Synthesis and Comparison with a TaqManTM Probe. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *404*, 59–68.
- [127] 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. Design of Molecular Beacons: 3' Couple Quenchers Improve Fluorogenic Properties of a Probe in Real-Time PCR Assay. *Analyst*, **2014**, *139*, 2867–2872.
- [128] Tsourkas, A.; Behlke, M.; Bao, G. Structure-Function Relationships of Shared-Stem and Conventional Molecular Beacons. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 4208–4215.
- [129] Crey-Desbiolles, C.; Ahn, D.-R.; Leumann, C.J. Molecular Beacons with a Homo-DNA Stem: Improving Target Selectivity. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, e77.
- [130] Berry, D.A.; Jung, K.-Y.; Wise, D.S.; Sercel, A.D.; Pearson, W.H.; Mackie, H.; Randolph, J.B.; Somers, R.L. Pyrrolo-dC and Pyrrolo-C: Fluorescent Analogs of Cytidine and 2'-

- Deoxycytidine for the Study of Oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 2457–2461.
- [131] Rai, P.; Cole, T.D.; Thompson, E.; Millar, D.P.; Linn, S. Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Studies Indicate an Unusual Conformation of 2-Aminopurine within ATAT and TATA Duplex DNA Sequences. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 2323–2332.
- [132] Kashida, H.; Takatsu, T.; Fujii, T.; Sekiguchi, K.; Liang, X.; Niwa, K.; Takase, T.; Yoshida, Y.; Asanuma, H. In-Stem Molecular Beacon Containing a Pseudo Base Pair of Threoninol Nucleotides for the Removal of Background Emission. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2009**, *48*, 7044–7047.
- [133] Yang, C.J.; Lin, H.; Tan, W. Molecular Assembly of Superquenchers in Signaling Molecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12772–12773.
- [134] Ryazantsev, D.; Tsybulsky, D.; Prokhorenko, I.; Kvach, M.; Martynenko, Y.; Philipchenko, P.; Shmanai, V.; Korshun, V.; Zavriev, S. Two-Dye and One- or Two-Quencher DNA Probes for Real-Time PCR Assay: Synthesis and Comparison with a TaqManTM Probe. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *404*, 59–68.
- [135] Grossmann, T.N.; Röglin, L.; Seitz, O. Triplex Molecular Beacons as Modular Probes for DNA Detection. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2007**, *46*, 5223–5225.
- [136] Chen, A.K.; Davydenko, O.; Behlke, M.A.; Tsourkas, A. Ratiometric Bimolecular Beacons for the Sensitive Detection of RNA in Single Living Cells. *Nucleic Acids Res.*, **2010**, *38*, e148.
- [137] Bourdoncle, A.; Estévez Torres, A.; Gosse, C.; Lacroix, L.; Vekhoff, P.; Le Saux, T.; Jullien, L.; Mergny, J. Quadruplex-Based Molecular Beacons as Tunable DNA Probes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 11094–11105.
- [138] Zhang, P.; Beck, T.; Tan, W. Design of a Molecular Beacon DNA Probe with Two Fluorophores. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2001**, *2194*, 416–419.
- [139] Jockusch, S.; Marti, A.A.; Turro, N.J.; Li, Z.; Li, X.; Ju, J.; Stevens, N.; Akins, D.L. Spectroscopic Investigation of a FRET Molecular Beacon Containing Two Fluorophores for Probing DNA/RNA Sequences. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, *5*, 493–498.
- [140] Holzhauser, C.; Wagenknecht, H. In-Stem-Labeled Molecular Beacons for Distinct Fluorescent Color Readout. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2011**, *50*, 7268–7272.
- [141] Bohländer, P.R.; Abba, M.L.; Bestvater, F.; Allgayer, H.; Wagenknecht, H.-A. Two Wavelength-Shifting Molecular Beacons for Simultaneous and Selective Imaging of Vesicular miRNA-21 and miRNA-31 in Living Cancer Cells. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 5001–5006.
- [142] Socher, E.; Bethge, L.; Knoll, A.; Jungnick, N.; Herrmann, A.; Seitz, O. Low-Noise Stemless PNA Beacons for Sensitive DNA and RNA Detection. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2008**, *47*, 9555–9559.
- [143] Tong, A.K.; Jockusch, S.; Li, Z.; Zhu, H.; Akins, D.L.; Turro, N.J. Triple Fluorescence Energy Transfer in Covalently Trichromophore-Labeled DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 12923–12924.
- [144] Tong, A.K.; Li, Z.; Jones, G.S.; Russo, J.J.; Ju, J. Combinatorial Fluorescence Energy Transfer Tags for Multiplex Biological Assays. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*, 756–759.
- [145] Li, X.; Li, Z.; Martí, A.A.; Jockusch, S.; Stevens, N.; Akins, D.L.; Turro, N.J.; Ju, J. Combinatorial Fluorescence Energy Transfer Molecular Beacons for Probing Nucleic Acid Sequences. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, *5*, 896–902.

- [146] Snare, M.J.; Thistlethwaite, P.J.; Ghigginio, K.P. Kinetic Studies of Intramolecular Excimer Formation in Dipyrenylalkanes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 3328–3332.
- [147] Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M. Unambiguous Detection of Target DNAs by Excimer–Monomer Switching Molecular Beacons. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 3271–3275.
- [148] Trkulja, I.; Biner, S.M.; Langenegger, S.M.; Häner, R. A Molecular Probe for the Detection of Homopurine Sequences. *ChemBioChem*, **2007**, *8*, 25–27.
- [149] Huang, J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Yang, X.; Yang, C.J.; Wang, K.; Tan, W. Pyrene-Excimer Probes Based on the Hybridization Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Fluids. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2011**, *50*, 401–404.
- [150] Conlon, P.; Yang, C.J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Martinez, K.; Kim, Y.; Stevens, N.; Marti, A.A.; Jockusch, S.; Turro, N.J.; Tan, W. Pyrene Excimer Signaling Molecular Beacons for Probing Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 336–342.
- [151] Yamana, K.; Ohshita, Y.; Fukunaga, Y.; Nakamura, M.; Maruyama, A. Bis-Pyrene-Labeled Molecular Beacon: A Monomer-Excimer Switching Probe for the Detection of DNA Base Alteration. *Bioorganic Med. Chem.*, **2008**, *16*, 78–83.
- [152] Häner, R.; Biner, S.M.; Langenegger, S.M.; Meng, T.; Malinovskii, V.L. A Highly Sensitive, Excimer-Controlled Molecular Beacon. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1227–1230.
- [153] Biner, S.M.; Häner, R. A Two-Color, Self-Controlled Molecular Beacon. *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 2733–2736.
- [154] Biner, S.M.; Kummer, D.; Malinovskii, V.L.; Robert, H. Signal Control by Self-Assembly of Fluorophores in a Molecular Beacon - a Model Study. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 2628–2633.
- [155] Nagatoishi, S.; Nojima, T.; Juskowiak, B.; Takenaka, S. A Pyrene-Labeled G-Quadruplex Oligonucleotide as a Fluorescent Probe for Potassium Ion Detection in Biological Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2005**, *44*, 5067–5070.
- [156] Dembska, A.; Juskowiak, B. Pyrene Functionalized Molecular Beacon with pH-Sensitive I-Motif in a Loop. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2015**, *150*, 928–933.
- [157] Dembska, A.; Rzepecka, P.; Juskowiak, B. Steady-State Fluorescence and Lifetime Emission Study of pH-Sensitive Probes Based on I-Motif Forming Oligonucleotides Single and Double Labeled with Pyrene. *Chemosensors*, **2015**, *3*, 211–223.
- [158] Zheng, J.; Li, J.; Jiang, Y.; Jin, J.; Wang, K.; Yang, R.; Tan, W. Design of Aptamer-Based Sensing Platform Using Triple-Helix Molecular Switch. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 6586–6592.
- [159] Chen, Y.; Yang, C.J.; Wu, Y.; Conlon, P.; Kim, Y.; Lin, H.; Tan, W. Light-Switching Excimer Beacon Assays for Ribonuclease H Kinetic Study. *Chembiochem*, **2008**, *9*, 355–359.
- [160] Yang, C.J.; Jockusch, S.; Vicens, M.; Turro, N.J.; Tan, W. Light-Switching Excimer Probes for Rapid Protein Monitoring in Complex Biological Fluids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, *102*, 17278–17283.
- [161] Zou, Z.; Qing, Z.; He, X.; Wang, K.; He, D.; Shi, H.; Yang, X.; Qing, T.; Yang, X. Ligation-Rolling Circle Amplification Combined with γ -Cyclodextrin Mediated Stemless Molecular Beacon for Sensitive and Specific Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphism. *Talanta*, **2014**, *125*, 306–312.

- [162] Zheng, J.; Li, J.; Gao, X.; Jin, J.; Wang, K.; Tan, W.; Yang, R. Modulating Molecular Level Space Proximity: A Simple and Efficient Strategy to Design Structured DNA Probes. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 3914–3921.
- [163] Huang, J.; Zhu, Z.; Bamrungsap, S.; Zhu, G.; You, M.; He, X.; Wang, K.; Tan, W. Competition-Mediated Pyrene-Switching Aptasensor: Probing Lysozyme in Human Serum with a Monomer-Excimer Fluorescence Switch. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 10158–10163.
- [164] Zheng, J.; Li, J.; Jiang, Y.; Jin, J.; Wang, K.; Yang, R.; Tan, W. Design of Aptamer-Based Sensing Platform Using Triple-Helix Molecular Switch. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 6586–6592.
- [165] Cardullo, R.A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, P.C.; Wolf, D.E. Detection of Nucleic Acid Hybridization by Nonradiative Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**, *85*, 8790–8794.
- [166] Sei-iida, Y.; Koshimoto, H.; Kondo, S.; Tsuji, A. Real-Time Monitoring of in Vitro Transcriptional RNA Synthesis Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, e59.
- [167] Tsuji, A.; Koshimoto, H.; Sato, Y.; Hirano, M.; Sei-iida, Y.; Kondo, S.; Ishibashi, K. Direct Observation of Specific Messenger RNA in a Single Living Cell under a Fluorescence Microscope. *Biophys. J.*, **2000**, *78*, 3260–3274.
- [168] Wang, L.; Gaigalas, A.K.; Blasic, J.; Holden, M.J.; Gallagher, D.T.; Pires, R. Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Donor – Acceptor Pair on Two Oligonucleotides Hybridized Adjacent to DNA Template. *Biopolymers*, **2003**, *72*, 401–412.
- [169] Martí, A.A.; Jockusch, S.; Stevens, N.; Ju, J.; Turro, N.J. Fluorescent Hybridization Probes for Sensitive and Selective DNA and RNA Detection. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 402–409.
- [170] Ebata, K.; Masuko, M.; Ohtani, H.; Kashiwasake-Jibu, M. Nucleic Acid Hybridization Accompanied with Excimer Formation from Two Pyrene-Labeled Probes. *Photochem. Photobiol.*, **1995**, *62*, 836–839.
- [171] Masuko, M.; Ohtani, H.; Ebata, K.; Shimadzu, A. Optimization of Excimer-Forming Two-Probe Nucleic Acid Hybridization Method with Pyrene as a Fluorophore. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 5409–5416.
- [172] Kierzek, R.; Li, Y.; Turner, D.H.; Bevilacqua, P.C. 5'-Amino Pyrene Provides a Sensitive, Nonperturbing Fluorescent Probe of RNA Secondary and Tertiary Structure Formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 4985–4992.
- [173] Paris, P.L.; Langenhan, J.M.; Kool, E.T. Probing DNA Sequences in Solution with a Monomer-Excimer Fluorescence Color Change. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 3789–3793.
- [174] Martí, A.; Li, X.; Jockusch, S.; Stevens, N.; Li, Z.; Raveendra, B.; Kalachikov, S.; Morozova, I.; Russo, J.; Akins, D.; Ju, J.; Turro, N. Design and Characterization of Two-Dye and Three-Dye Binary Fluorescent Probes for mRNA Detection. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 3591–3600.
- [175] Bichenkova, E. V.; Yu, X.; Bhadra, P.; Heissigerova, H.; Pope, S.J.A.; Coe, B.J.; Faulkner, S.; Douglas, K.T. DNA Mismatch Detection by Resonance Energy Transfer between ruthenium(II) and osmium(II) tris(2,2'-bipyridyl) Chromophores. *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 4112–4114.
- [176] Bichenkova, E. V.; Gbaj, A.; Walsh, L.; Savage, H.E.; Rogert, C.; Sardarian, A.R.;

- Etchells, L.L.; Douglas, K.T. Detection of Nucleic Acids in Situ : Novel Oligonucleotide Analogues for Target-Assembled DNA-Mounted Exciplexes. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1039–1051.
- [177] Walsh, L.; Gbaj, A.; Savage, H.; Bacigalupo, M.; Bichenkova, E.; Douglas, K. Target-Assembled ExciProbes: Application to DNA Detection at the Level of PCR Product and Plasmid DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2007**, *25*, 219–230.
- [178] Bratu, D.P.; Cha, B.-J.B.; Mhlanga, M.M.; Kramer, F.R.; Tyagi, S. Visualizing the Distribution and Transport of mRNAs in Living Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 13308–13313.
- [179] Jones, R.; Baker, M.B.; Weber, M.; Harrison, D.G.; Bao, G.; Searles, C.D. Molecular Beacons Can Assess Changes in Expression and 3'-polyadenylation of Human eNOS mRNA. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2009**, *296*, 498–504.
- [180] Sueda, S.; Yuan, J.; Matsumoto, K.; Tb, T. A Homogeneous DNA Hybridization System by Using a New Luminescence Terbium Chelate. *Bioconjug. Chem.*, **2002**, *13*, 200–205.
- [181] Sueda, S.; Yuan, J.; Matsumoto, K. Homogeneous DNA Hybridization Assay by Using Europium Luminescence Energy Transfer. *Bioconjug. Chem.*, **2000**, *11*, 827–831.
- [182] Marti, A.A.; Puckett, C.A.; Dyer, J.; Stevens, N.; Jockusch, S.; Ju, J.; Barton, J.K.; Turro, N.J. Inorganic-Organic Hybrid Luminescent Binary Probe for DNA Detection Based on Spin-Forbidden Resonance Energy Transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 8680–8681.
- [183] Oser, A.; Valet, G. Nonradioactive Assay of DNA Hybridization by DNA-Template-Mediated Formation of a Ternary TbIII Complex in Pure Liquid Phase. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **1990**, *29*, 1167–1169.
- [184] Wang, G.; Yuan, J.; Matsumoto, K.; Hu, Z. Homogeneous Time-Resolved Fluorescence DNA Hybridization Assay by DNA-Mediated Formation of an EDTA-Eu(III)- β -Diketonate Ternary Complex. *Anal. Biochem.*, **2001**, *299*, 169–172.
- [185] Kitamura, Y.; Ihara, T.; Tsujimura, Y.; Osawa, Y.; Tazaki, M.; Jyo, A. Colorimetric Allele Typing through Cooperative Binding of DNA Probes Carrying a Metal Chelator for Luminescent Lanthanide Ions. *Anal. Biochem.*, **2006**, *359*, 259–261.
- [186] Kitamura, Y.; Ihara, T.; Tsujimura, Y.; Osawa, Y.; Sasahara, D.; Yamamoto, M.; Okada, K.; Tazaki, M.; Jyo, A. Template-Directed Formation of Luminescent Lanthanide Complexes: Versatile Tools for Colorimetric Identification of Single Nucleotide Polymorphism. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 1921–1931.
- [187] Karhunen, U.; Jaakkola, L.; Wang, Q.; Lamminmäki, U.; Soukka, T. Luminescence Switching by Hybridization-Directed Mixed Lanthanide Complex Formation. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 751–754.
- [188] Päckilä, H.; Blom, S.; Kopra, K.; Soukka, T. Aptamer-Directed Lanthanide Chelate Self-Assembly for Rapid Thrombin Detection. *Analyst*, **2013**, *138*, 5107–5112.
- [189] Karhunen, U.; Soikkeli, M.; Lahdenperä, S.; Soukka, T. Analytica Chimica Acta Quantitative Detection of Well-Based DNA Array Using Switchable Lanthanide Luminescence. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, *772*, 87–92.
- [190] Lahdenperä, S.; Spangar, A.; Lempainen, A.-M.; Joki, L.; Soukka, T. An Integrated Closed-Tube 2-Plex PCR Amplification and Hybridization Assay with Switchable Lanthanide Luminescence Based Spatial Detection. *Analyst*, **2015**, *140*, 3960–3968.
- [191] Lehmusvuori, A.; Karhunen, U.; Tapio, A.; Lamminmäki, U.; Soukka, T. High-Performance Closed-Tube PCR Based on Switchable Luminescence Probes. *Anal. Chim.*

Acta, **2012**, *731*, 88–92.

- [192] Karhunen, U.; Malmi, E.; Brunet, E.; Rodríguez-Ubis, J.C.; Soukka, T. Switchable Lanthanide Luminescent Binary Probes in Efficient Single Nucleotide Mismatch Discrimination. *Sensors Actuators B Chem.*, **2015**, *211*, 297–302.
- [193] Niu, C.; Liu, J.; Qin, P.; Zeng, G.; Ruan, M.; He, H. A Novel Bifunctional Europium Chelate Applied in Quantitative Determination of Human Immunoglobulin G Using Time-Resolved Fluoroimmunoassay. *Anal. Biochem.*, **2011**, *409*, 244–248.
- [194] Päckilä, H.; Malmi, E.; Lahtinen, S.; Soukka, T. Rapid Homogeneous Immunoassay for Cardiac Troponin I Using Switchable Lanthanide Luminescence. *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, *62*, 201–207.
- [195] Wang, G.; Yuan, J.; Matsumoto, K.; Hu, Z. Homogeneous Time-Resolved Fluorescence DNA Hybridization Assay by DNA-Mediated Formation of an EDTA-Eu(III)-Beta-Diketonate Ternary Complex. *Anal. Biochem.*, **2001**, *299*, 169–172.
- [196] Xu, Y.; Karalkar, N.B.; Kool, E.T. Nonenzymatic Autoligation in Direct Three-Color Detection of RNA and DNA Point Mutations. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*, 148–152.
- [197] Sando, S.; Kool, E.T. Quencher as Leaving Group: Efficient Detection of DNA-Joining Reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2096–2097.
- [198] Silverman, A.P.; Baron, E.J.; Kool, E.T. RNA-Templated Chemistry in Cells: Discrimination of *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella* Bacterial Strains With a New Two-Color FRET Strategy. *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 1890–1894.
- [199] Silverman, A.P.; Kool, E.T. Quenched Autoligation Probes Allow Discrimination of Live Bacterial Species by Single Nucleotide Differences in rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, 4978–4986.
- [200] Silverman, A.P.; Abe, H.; Kool, E.T. Quenched Autoligation Probes. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; **2008**; Vol. 429, pp. 161–170.
- [201] Abe, H.; Kool, E.T. Flow Cytometric Detection of Specific RNAs in Native Human Cells with Quenched Autoligating FRET Probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, *103*, 263–268.
- [202] Miller, G.P.; Silverman, A.P.; Kool, E.T. New, Stronger Nucleophiles for Nucleic Acid-Templated Chemistry: Synthesis and Application in Fluorescence Detection of Cellular RNA. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 56–64.
- [203] Franzini, R.M.; Kool, E.T. Efficient Nucleic Acid Detection by Templated Reductive Quencher Release. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16021–16023.
- [204] Huang, Y.; Coull, J.M. Diamine Catalyzed Hemicyanine Dye Formation from Nonfluorescent Precursors through DNA Programmed Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 3238–3239.
- [205] Franzini, R.M.; Kool, E.T. Organometallic Activation of a Fluorogen for Templated Nucleic Acid Detection. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 2935–2938.
- [206] Franzini, R.M.; Kool, E.T. Improved Templated Fluorogenic Probes Enhance the Analysis of Closely Related Pathogenic Bacteria by Microscopy and Flow Cytometry. *Bioconjug. Chem.*, **2011**, *22*, 1869–1877.
- [207] Li, H.; Franzini, R.M.; Bruner, C.; Kool, E.T. Templated Chemistry for Sequence-Specific Fluorogenic Detection of Duplex DNA. *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 2132–2137.
- [208] Kleinbaum, D.J.; Miller, G.P.; Kool, E.T. Double Displacement: An Improved Bioorthogonal Reaction Strategy for Templated Nucleic Acid Detection. *Bioconjug.*

- Chem.*, **2010**, *21*, 1115–1120.
- [209] Franzini, R.M.; Kool, E.T. Two Successive Reactions on a DNA Template: A Strategy for Improving Background and Specificity in Nucleic Acid Detection. *Chemistry (Easton)*, **2011**, *17*, 2168–2175.
- [210] Grossmann, T.N.; Seitz, O. DNA-Catalyzed Transfer of a Reporter Group. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 15596–15597.
- [211] Grossmann, T.N.; Seitz, O. Nucleic Acid Templated Reactions: Consequences of Probe Reactivity and Readout Strategy for Amplified Signaling and Sequence Selectivity. *Chem. - A Eur. J.*, **2009**, *15*, 6723–6730.
- [212] Ma, Z.; Taylor, J.-S. Nucleic Acid-Triggered Catalytic Drug Release. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, *97*, 11159–11163.
- [213] Ma, Z.; Taylor, J.-S. Nucleic Acid Triggered Catalytic Drug and Probe Release : A New Concept for the Design of Chemotherapeutic and Diagnostic Agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 2501–2510.
- [214] Ma, Z.; Taylor, J. PNA-Based RNA-Triggered Drug-Releasing System. *Bioconjug. Chem.*, **2003**, *14*, 679–683.
- [215] Cai, J.; Li, X.; Taylor, J.S. Improved Nucleic Acid Triggered Probe Activation through the Use of a 5-Thiomethyluracil Peptide Nucleic Acid Building Block. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 751–754.
- [216] Lemieux, G.A.; Graffenried, C.L. De; Bertozzi, C.R. A Fluorogenic Dye Activated by the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4708–4709.
- [217] Saxon, E.; Bertozzi, C.R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science (80-.)*, **2000**, *287*, 2007–2010.
- [218] Cai, J.; Li, X.; Yue, X.; Taylor, J.S.; V, W.U.; Brookings, O.; Dri, V.; Louis, S. Nucleic Acid-Triggered Fluorescent Probe Activation by the Staudinger Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16324–16325.
- [219] Abe, H.; Wang, J.; Furukawa, K.; Oki, K.; Uda, M.; Tsuneda, S.; Ito, Y. A Reduction-Triggered Fluorescence Probe for Sensing Nucleic Acids. *Bioconjug. Chem.*, **2008**, *19*, 1219–1226.
- [220] Pianowski, Z.; Gorska, K.; Oswald, L.; Merten, C.A.; Winssinger, N. Imaging of mRNA in Live Cells Using Nucleic Acid-Templated Reduction of Azidorhodamine Probes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6492–6497.
- [221] Tamura, Y.; Furukawa, K.; Yoshimoto, R.; Kawai, Y.; Yoshida, M. Detection of Pre-mRNA Splicing in Vitro by an RNA-Templated Fluorogenic Reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 7248–7251.
- [222] Furukawa, K.; Abe, H.; Wang, J.; Uda, M.; Koshino, H. Reduction-Triggered Red Fluorescent Probes for Dual-Color Detection of Oligonucleotide Sequences. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 671–677.
- [223] Pianowski, Z.L.; Winssinger, N. Fluorescence-Based Detection of Single Nucleotide Permutation in DNA via Catalytically Templated Reaction. *Chem. Commun.*, **2007**, *0*, 3820–3822.
- [224] Franzini, R.M.; Kool, E.T. 7-Azidomethoxy-Coumarins as Profluorophores for Templated Nucleic Acid Detection. *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 2981–2988.
- [225] Saneyoshi, H.; Shimada, N.; Maruyama, A.; Ito, Y.; Abe, H. Polycation-Assisted DNA

- Detection by Reduction Triggered Fluorescence Amplification Probe. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 6851–6853.
- [226] Chen, Y.; Kamlet, A.S.; Steinman, J.B.; Liu, D.R. A Biomolecule-Compatible Visible-Light-Induced Azide Reduction from a DNA-Encoded Reaction-Discovery System. *Nat. Chem.*, **2011**, *3*, 146–153.
- [227] Sadhu, K.K.; Winssinger, N. Detection of miRNA in Live Cells by Using Templated Ru II-Catalyzed Unmasking of a Fluorophore. *Chem. - A Eur. J.*, **2013**, *19*, 8182–8189.
- [228] Röthlingshöfer, M.; Gorska, K.; Winssinger, N. Nucleic Acid Templated Uncaging of Fluorophores Using Ru-Catalyzed Photoreduction with Visible Light. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 482–485.
- [229] Röthlingshöfer, M.; Gorska, K.; Winssinger, N. Nucleic Acid-Templated Energy Transfer Leading to a Photorelease Reaction and Its Application to a System Displaying a Nonlinear Response. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 18110–18113.
- [230] Calderone, C.T.; Puckett, J.W.; Gartner, Z.J.; Liu, D.R. Directing Otherwise Incompatible Reactions in a Single Solution by Using DNA-Templated Organic Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4104–4108.
- [231] Prusty, D.K.; Herrmann, A. A Fluorogenic Reaction Based on Heavy-Atom Removal for Ultrasensitive DNA Detection. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12197–12199.
- [232] Shibata, A.; Uzawa, T.; Nakashima, Y.; Ito, M.; Nakano, Y.; Shuto, S.; Ito, Y.; Abe, H. Very Rapid DNA-Templated Reaction for Efficient Signal Amplification and Its Steady-State Kinetic Analysis of the Turnover Cycle. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 14172–14178.
- [233] Pianowski, Z.L.; Winssinger, N.; Liu, D.R.; Bole-Feysot, C.; Mason, D.E.; Kuzmic, P.; Harris, J.L.; Winssinger, N. Fluorescence-Based Detection of Single Nucleotide Permutation in DNA via Catalytically Templated Reaction. *Chem. Commun.*, **2007**, *41*, 3820–3822.
- [234] Röthlingshöfer, M.; Gorska, K.; Winssinger, N. Nucleic Acid Templated Uncaging of Fluorophores Using Ru-Catalyzed Photoreduction with Visible Light. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 482–485.
- [235] Holland, P.M.; Abramson, R.D.; Watson, R.; Gelfand, D.H. Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'----3' Exonuclease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1991**, *88*, 7276–7280.
- [236] Lee, L.G.; Connell, C.R.; Bloch, W. Allelic Discrimination by Nick-Translation PCR with Fluorogenic Probes. *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*, 3761–3766.
- [237] Gibson, U.E.; Heid, C.A.; Williams, P.M. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, **1996**, *6*, 995–1001.
- [238] Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J.; Williams, P.M. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.*, **1996**, *6*, 986–994.
- [239] Kutuyavin, I. V.; Afonina, I.A.; Mills, A.; Gorn, V. V.; Lukhtanov, E.A.; Belousov, E.S.; Singer, M.J.; Walburger, D.K.; Lokhov, S.G.; Gall, A.A.; Dempcy, R.; Reed, M.W.; Meyer, R.B.; Hedgpeth, J. 3'-Minor Groove Binder-DNA Probes Increase Sequence Specificity at PCR Extension Temperatures. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 655–661.
- [240] Nurmi, J.; Kiviniemi, M.; Kujanpää, M.; Sjöroos, M.; Ilonen, J.; Lövgren, T. High-Throughput Genetic Analysis Using Time-Resolved Fluorometry and Closed-Tube

- Detection. *Anal. Biochem.*, **2001**, *299*, 211–217.
- [241] Whitcombe, D.; Theaker, J.; Guy, S.P.; Brown, T.; Little, S. Detection of PCR Products Using Self-Probing Amplicons and Fluorescence. *Nat. Biotechnol.*, **1999**, *17*, 804–807.
- [242] Huang, Y.; Kong, D.; Yang, Y.; Niu, R.; Shen, H.; Mi, H. Real-Time Quantitative Assay of Telomerase Activity Using the Duplex Scorpion Primer. *Biotechnol. Lett.*, **2004**, *26*, 891–895.
- [243] Nazarenko, I.A.; Bhatnagar, S.K.; Hohman, R.J. A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based on Energy Transfer. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 2516–2521.
- [244] Winn-Deen, E.S. Direct Fluorescence Detection of Allele-Specific PCR Products Using Novel Energy-Transfer Labeled Primers. *Mol. Diagnosis*, **1998**, *3*, 217–221.
- [245] Nazarenko, I.; Lowe, B.; Darfler, M.; Ikononi, P.; Schuster, D.; Rashtchian, A. Multiplex Quantitative PCR Using Self-Quenched Primers Labeled with a Single Fluorophore. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, e37.
- [246] Kandimalla, E.R.; Agrawal, S. “Cyclicons” as Hybridization-Based Fluorescent Primer-Probes: Synthesis, Properties and Application in Real-Time PCR. *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 1911–1916.
- [247] Lee, M.A.; Siddle, A.L.; Page, R.H. ResonSense®: Simple Linear Fluorescent Probes for Quantitative Homogeneous Rapid Polymerase Chain Reaction. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *457*, 61–70.
- [248] Jung, Y.; Jeong, M.L.; Jung, H.; Bong, H.C. Self-Directed and Self-Oriented Immobilization of Antibody by Protein G-DNA Conjugate. *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 6534–6541.
- [249] Navarro, E.; Serrano-Heras, G.; Castaño, M.J.; Solera, J. Real-Time PCR Detection Chemistry. *Clinica Chimica Acta*, **2015**, *439*, 231–250.
- [250] French, D.J.; Archard, C.L.; Brown, T.; McDowell, D.G. HyBeacon™ Probes: A New Tool for DNA Sequence Detection and Allele Discrimination. *Mol. Cell. Probes*, **2001**, *15*, 363–374.
- [251] French, D.J.; Archard, C.L.; Andersen, M.T.; McDowell, D.G. Ultra-Rapid DNA Analysis Using HyBeacon™ Probes and Direct PCR Amplification from Saliva. *Mol. Cell. Probes*, **2002**, *16*, 319–326.
- [252] Li, Q.; Luan, G.; Guo, Q.; Liang, J. A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, e5.
- [253] Cheng, J.; Zhang, Y.; Li, Q. Real-Time PCR Genotyping Using Displacing Probes. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, e61.
- [254] Guo, Q.; Zhou, Y.; Wang, X.; Li, Q. Simultaneous Detection of Trisomies 13, 18, and 21 with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification-Based Real-Time PCR. *Clin. Chem.*, **2010**, *56*, 1451–1459.
- [255] Nurmi, J.; Wikman, T.; Karp, M.; Lövgren, T. High-Performance Real-Time Quantitative RT-PCR Using Lanthanide Probes and a Dual-Temperature Hybridization Assay. *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 3525–3532.
- [256] Yamana, K.; Takei, M.; Nakano, H. Synthesis of Oligonucleotide Derivatives Containing Pyrene Labeled Glycerol Linkers: Enhanced Excimer Fluorescence on Binding to a Complementary DNA Sequence. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 6051–6054.

- [257] Yamana, K.; Iwase, R.; Furutani, S.; Tsuchida, H.; Zako, H.; Yamaoka, T.; Murakami, A. 2'-Pyrene Modified Oligonucleotide Provides a Highly Sensitive Fluorescent Probe of RNA. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 2387–2392.
- [258] Yamana, K.; Iwai, T.; Ohtani, Y.; Sato, S.; Nakamura, M.; Nakano, H. Bis-Pyrene-Labeled Oligonucleotides: Sequence Specificity of Excimer and Monomer Fluorescence Changes upon Hybridization with DNA. *Bioconjug. Chem.*, **2002**, *13*, 1266–1273.
- [259] Yamana, K.; Ohtani, Y.; Nakano, H.; Saito, I. Bis-Pyrene Labeled DNA Aptamer as an Intelligent Fluorescent Biosensor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3429–3431.
- [260] Yamana, K.; Zako, H.; Asazuma, K.; Iwase, R.; Nakano, H.; Murakami, A. Fluorescence Detection of Specific RNA Sequences Using 2'-Pyrene-Modified Oligoribonucleotides. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1104–1106.
- [261] Mahara, A.; Iwase, R.; Sakamoto, T.; Yamana, K.; Yamaoka, T.; Murakami, A. Bispyrene-Conjugated 2'-O-Methyloligonucleotide as a Highly Specific RNA-Recognition Probe. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2002**, *41*, 3648–3650.
- [262] Nakamura, M.; Fukunaga, Y.; Sasa, K.; Ohtoshi, Y.; Kanaori, K.; Hayashi, H.; Nakano, H.; Yamana, K. Pyrene Is Highly Emissive When Attached to the RNA Duplex but Not to the DNA Duplex: The Structural Basis of This Difference. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, 5887–5895.
- [263] Moran, N.; Bassani, D.M.; Desvergne, J.-P.; Keiper, S.; Lowden, P.A.S.; Vyle, J.S.; Tucker, J.H.R. Detection of a Single DNA Base-Pair Mismatch Using an Anthracene-Tagged Fluorescent Probe. *Chem. Commun.*, **2006**, *0*, 5003–5005.
- [264] Prokhorenko, I.A.; Malakhov, A.D.; Kozlova, A.A.; Momynaliev, K.; Govorun, V.M.; Korshun, V.A. Phenylethynylpyrene-Labeled Oligonucleotide Probes for Excimer Fluorescence SNP Analysis of 23S rRNA Gene in Clarithromycin-Resistant Helicobacter Pylori Strains. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **2006**, *599*, 144–151.
- [265] Sekiguchi, T.; Ebara, Y.; Moriguchi, T.; Shinozuka, K. Novel Sequence-Responding Fluorescent oligoDNA Probe Bearing a Silylated Pyrene Molecule. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 6883–6886.
- [266] Okamoto, A.; Ichiba, T.; Saito, I. Pyrene-Labeled Oligodeoxynucleotide Probe for Detecting Base Insertion by Excimer Fluorescence Emission. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8364–8365.
- [267] Hwang, G.T.; Seo, Y.J.; Kim, B.H. A Highly Discriminating Quencher-Free Molecular Beacon for Probing DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 6528–6529.
- [268] Moriguchi, T.; Ichimura, M.; Kato, M.; Suzuki, K.; Takahashi, Y.; Shinozuka, K. Development of the Excimer Probe Responsible for DNA Target Bearing the Silylated Pyrenes at Base Moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 4372–4375.
- [269] Bag, S.S.; Kundu, R.; Matsumoto, K.; Saito, Y.; Saito, I. Singly and Doubly Labeled Base-Discriminating Fluorescent Oligonucleotide Probes Containing Oxo-Pyrene Chromophore. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 3227–3230.
- [270] Saito, Y. Design of Base-Discriminating Fluorescent (BDF) Nucleobase for SNP Typing. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2004**, *48*, 243–244.
- [271] Akimitsu, O.; Kanatani, K.; Saito, I. Pyrene-Labeled Base-Discriminating Fluorescent DNA Probes for Homogeneous SNP Typing. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4820–4827.
- [272] Saito, Y.; Bag, S.S.; Kusakabe, Y.; Nagai, C.; Matsumoto, K.; Mizuno, E.; Kodate, S.; Suzuka, I.; Saito, I. Dual-Labeled Oligonucleotide Probe for Sensing Adenosine via

- FRET: A Novel Alternative to SNPs Genotyping. *Chem. Commun.*, **2007**, 0, 2133–2135.
- [273] Novopashina, D.S.; Stetsenko, D.A.; Totskaya, O.S.; Repkova, M.N.; Venyaminova, A.G. 2'-bis-Pyrene Modified Oligonucleotides: Sensitive Fluorescent Probes of Nucleic Acids Structure. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids*, **2005**, 24, 729–734.
- [274] Dohno, C.; Saito, I. Discrimination of Single-Nucleotide Alterations by G-Specific Fluorescence Quenching. *ChemBioChem*, **2005**, 6, 1075–1081.
- [275] Van Daele, I.; Bomholt, N.; Filichev, V. V.; Van Calenbergh, S.; Pedersen, E.B. Triplex Formation by Pyrene-Labelled Probes for Nucleic Acid Detection in Fluorescence Assays. *ChemBioChem*, **2008**, 9, 791–801.
- [276] Hrdlicka, P.J.; Babu, B.R.; Sørensen, M.D.; Harrit, N.; Wengel, J. Multilabeled Pyrene-Functionalized 2'-amino-LNA Probes for Nucleic Acid Detection in Homogeneous Fluorescence Assays. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 13293–13299.
- [277] Honcharenko, D.; Zhou, C.; Chattopadhyaya, J. Modulation of Pyrene Fluorescence in DNA Probes Depends upon the Nature of the Conformationally Restricted Nucleotide. *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 2829–2842.
- [278] Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. The Interactions between the Fluorescent Dye Thiazole Orange and DNA. *Biopolymers*, **1998**, 46, 39–51.
- [279] Rye, H.S.; Yue, S.; Wemmer, D.E.; Quesada, M.A.; Haugland, R.P.; Mathies, R.A.; Glazer, A.N. Stable Fluorescent Complexes of Double-Stranded DNA with Bis-Intercalating Asymmetric Cyanine Dyes: Properties and Applications. *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 2803–2812.
- [280] Petty, J.T.; Bordelon, J.A.; Robertson, M.E. Thermodynamic Characterization of the Association of Cyanine Dyes with DNA. *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 7221–7227.
- [281] Gurrieri, S.; Wells, K.S.; Johnson, I.D.; Bustamante, C. Direct Visualization of Individual DNA Molecules by Fluorescence Microscopy: Characterization of the Factors Affecting Signal/Background and Optimization of Imaging Conditions Using YOYO. *Anal. Biochem.*, **1997**, 249, 44–53.
- [282] Stephen, T.Y.; Singer, V.L.; Roth, B.L.; Mozer, T.J.; Millard, P.J.; Jones, L.J.; Jin, X.; P, R. Substituted Unsymmetrical Cyanine Dyes with Selected Permeability. US 5658751 A, October 27, **1994**.
- [283] Okamoto, A. ECHO Probes: A Concept of Fluorescence Control for Practical Nucleic Acid Sensing. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5815–5828.
- [284] Isacson, J.; Cao, H.; Ohlsson, L.; Nordgren, S.; Svanvik, N.; Westman, G.; Kubista, M.; Sjöback, R.; Sehlstedt, U. Rapid and Specific Detection of PCR Products Using Light-up Probes. *Mol. Cell. Probes*, **2000**, 14, 321–328.
- [285] Svanvik, N.; Ståhlberg, A.; Sehlstedt, U.; Sjöback, R.; Kubista, M. Detection of PCR Products in Real Time Using Light-up Probes. *Anal. Biochem.*, **2000**, 287, 179–182.
- [286] Köhler, O.; Jarikote, D.V.; Seitz, O. Forced Intercalation Probes (FIT Probes): Thiazole Orange as a Fluorescent Base in Peptide Nucleic Acids for Homogeneous Single-Nucleotide-Polymorphism Detection. *ChemBioChem*, **2005**, 6, 69–77.
- [287] Chassignol, M.; Aubert, Y.; Roig, V.; Asseline, U. Detection of Terminal Mismatches on DNA Duplexes in Homogeneous Assays or with Immobilized Probes. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2007**, 26, 1669–1672.
- [288] Asseline, U.; Chassignol, M.; Aubert, Y.; Roig, V. Detection of Terminal Mismatches on DNA Duplexes with Fluorescent Oligonucleotides. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 1949–

1957.

- [289] Privat, E.; Melvin, T.; Asseline, U.; Vigny, P. Oligonucleotide-Conjugated Thiazole Orange Probes as “light-Up” Probes for Messenger Ribonucleic Acid Molecules in Living Cells. *Photochem. Photobiol.*, **2001**, *74*, 532–541.
- [290] Hövelmann, F.; Gaspar, I.; Chamiolo, J.; Kasper, M.; Steffen, J.; Ephrussi, A.; Seitz, O. LNA-Enhanced DNA FIT-Probes for Multicolour RNA Imaging. *Chem. Sci.*, **2015**, *7*, 128–135.
- [291] Huang, J. Excimer Molecular Beacon. In *Molecular Beacons*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2013**; pp. 123–138.
- [292] Kolpashchikov, D.M. Binary Probes for Nucleic Acid Analysis. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 4709–4723.
- [293] Häner, R.; Biner, S.M.; Langenegger, S.M.; Meng, T.; Malinovskii, V.L. A Highly Sensitive, Excimer-Controlled Molecular Beacon. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1227–1230.
- [294] Biner, S.M.; Kummer, D.; Malinovskii, V.L.; Robert, H.; Häner, R.; Banerji, N.; Vauthey, E.; Bollot, G.; Mareda, J.; Roger, C.; Würthner, F.; Sakai, N.; Matile, S.; Tan, W.H. Signal Control by Self-Assembly of Fluorophores in a Molecular Beacon—a Model Study. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 2628–2633.
- [295] Yorozu, T.; Hoshino, M.; Imamura, M. Fluorescence Studies of Pyrene Inclusion Complexes with .alpha.-, .beta.-, and .gamma.-Cyclodextrins in Aqueous Solutions. Evidence for Formation of Pyrene Dimer in .gamma.-Cyclodextrin Cavity. *J. Phys. Chem.*, **1982**, *86*, 4426–4429.
- [296] Korshun, V.A.; Pestov, N.B.; Birikh, K.R.; Berlin, Y.A. Reagent for Introducing Pyrene Residues in Oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.*, **1992**, *3*, 559–562.
- [297] Yao, C.; Kraatz, H.-B.; Steer, R.P. Photophysics of Pyrene-Labelled Compounds of Biophysical Interest. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, *4*, 191–199.
- [298] Ryazantsev, D.; Kvach, M.; Tsybul'sky, D.; Prokhorenko, I.; Stepanova, I.; Martynenko, Y.; Gontarev, S.; Shmanai, V.; Zavriev, S.; Korshun, V. Design of Molecular Beacons: 3' Couple Quenchers Improve Fluorogenic Properties of a Probe in Real-Time PCR Assay. *Analyst*, **2014**, *139*, 2867–2872.
- [299] Tsybul'sky, 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. Molecular Beacons with JOE Dye: Influence of Linker and 3' Couple Quencher. *Mol. Cell. Probes*, **2016**, *30*, 285–290.
- [300] Astakhova, K.; Golovin, A. V.; Prokhorenko, I.A.; Ustinov, A. V.; Stepanova, I.A.; Zatsepin, T.S.; Korshun, V.A. Design of 2'-Phenylethynylpyrene Excimer Forming DNA/RNA Probes for Homogeneous SNP Detection: The Attachment Manner Matters. *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 3220–3230.
- [301] Mujumdar, R.B.; Ernst, L.A.; Mujumdar, S.R.; Lewis, C.J.; Waggoner, A.S. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjug. Chem.*, **1993**, *4*, 105–111.
- [302] Fuchs, B.M.; Syutsubo, K.; Ludwig, W.; Amann, R. In Situ Accessibility of Escherichia Coli 23S rRNA to Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, *67*, 961–968.
- [303] Inácio, J.; Behrens, S.; Fuchs, B.M.; Fonseca, A.; Spencer-Martins, I.; Amann, R. In Situ

- Accessibility of *Saccharomyces Cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes Comprising the D1 and D2 Domains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, *69*, 2899–2905.
- [304] Behrens, S.; Fuchs, B.M.; Mueller, F.; Amann, R. Is the in Situ Accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia Coli* for Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes Predicted by a Three-Dimensional Structure Model of the 30S Ribosomal Subunit? *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, *69*, 4935–4941.
- [305] Chan, K.M.; Kölmel, D.K.; Wang, S.; Kool, E.T. Color-Change Photoswitching of an Alkynylpyrene Excimer Dye. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2017**, *56*, 6497–6501.
- [306] Teo, Y.N.; Kool, E.T. Polyfluorophore Excimers and Exciplexes as FRET Donors in DNA. *Bioconjug. Chem.*, **2009**, *20*, 2371–2380.
- [307] Duhamel, J. Global Analysis of Fluorescence Decays to Probe the Internal Dynamics of Fluorescently Labeled Macromolecules. *Langmuir*, **2014**, *30*, 2307–2324.
- [308] Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, *40*, 2004–2021.
- [309] Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057–3064.
- [310] El-sagheer, A.H.; Brown, T.; Brown, T. Click Chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 1388–1405.
- [311] Chen, X.; Wu, Y.-W. Selective Chemical Labeling of Proteins. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 5417–5439.
- [312] Cervantes-Cervantes, M.P.; Calderón-Salinas, J.V.; Albores, A.; Muñoz-Sánchez, J.L. Copper Increases the Damage to DNA and Proteins Caused by Reactive Oxygen Species. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2005**, *103*, 229–248.
- [313] Rossi, F.M.; Kao, J.P.Y. Practical Method for the Multigram Separation of the 5- and 6-Isomers of Carboxyfluorescein. *Bioconjug. Chem.*, **1997**, *8*, 495–497.
- [314] Zhang, K.; Hao, L.; Hurst, S.J.; Mirkin, C.A. Antibody-Linked Spherical Nucleic Acids for Cellular Targeting. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 16488–16491.
- [315] Cuellar, T.L.; Barnes, D.; Nelson, C.; Tanguay, J.; Yu, S.F.; Wen, X.; Scales, S.J.; Gesch, J.; Davis, D.; Van Brabant Smith, A.; Leake, D.; Vandlen, R.; Siebel, C.W. Systematic Evaluation of Antibody-Mediated siRNA Delivery Using an Industrial Platform of THIOMAB-siRNA Conjugates. *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, 1189–1203.
- [316] Sano, T.; Cantor, C.R. A Streptavidin-Protein A Chimera That Allows One-Step Production of a Variety of Specific Antibody Conjugates. *Biotechnology. (N. Y.)*, **1991**, *9*, 1378–1381.
- [317] Mehta, P.K.; Raj, A.; Singh, N.P.; Khuller, G.K. Detection of Potential Microbial Antigens by Immuno-PCR (PCR-Amplified Immunoassay). *J. Med. Microbiol.*, **2014**, *63*, 627–641.
- [318] Chang, L.; Li, J.; Wang, L. Immuno-PCR: An Ultrasensitive Immunoassay for Biomolecular Detection. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, *910*, 12–24.
- [319] Malou, N.; Raoult, D. Immuno-PCR: A Promising Ultrasensitive Diagnostic Method to Detect Antigens and Antibodies. *Trends Microbiol.*, **2011**, *19*, 295–302.
- [320] Söderberg, O.; Gullberg, M.; Jarvius, M.; Ridderstråle, K.; Leuchowius, K.-J.; Jarvius, J.;

- Wester, K.; Hydbring, P.; Bahram, F.; Larsson, L.-G.; Landegren, U. Direct Observation of Individual Endogenous Protein Complexes in Situ by Proximity Ligation. *Nat. Methods*, **2006**, *3*, 995–1000.
- [321] Gullberg, M.; Gustafsdottir, S.M.; Schallmeiner, E.; Jarvius, J.; Bjarnegard, M.; Betsholtz, C.; Landegren, U.; Fredriksson, S. Cytokine Detection by Antibody-Based Proximity Ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, *101*, 8420–8424.
- [322] Coyle, M.P.; Xu, Q.; Chiang, S.; Francis, M.B.; Groves, J.T. DNA-Mediated Assembly of Protein Heterodimers on Membrane Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 5012–5016.
- [323] Kazane, S.A.; Axup, J.Y.; Kim, C.H.; Ciobanu, M.; Wold, E.D.; Barluenga, S.; Hutchins, B.A.; Schultz, P.G.; Winssinger, N.; Smider, V. V. Self-Assembled Antibody Multimers through Peptide Nucleic Acid Conjugation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *135*, 340–346.
- [324] Presolski, S.I.; Hong, V.P.; Finn, M.G. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, **2011**, *3*, 153–162.
- [325] Wittig, G.; Krebs, A. Zur Existenz Niedergliedriger Cycloalkine, I. *Chem. Ber.*, **1961**, *94*, 3260–3275.
- [326] Dommerholt, J.; Rutjes, F.P.J.T.; van Delft, F.L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top. Curr. Chem.*, **2016**, *374*, 1–20.
- [327] Gordon, C.G.; Mackey, J.L.; Jewett, J.C.; Sletten, E.M.; Houk, K.N.; Bertozzi, C.R. Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 9199–9208.
- [328] Sletten, E.M.; Bertozzi, C.R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, *48*, 6974–6998.
- [329] A High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Purification of Mouse Monoclonal Antibodies. *Anal. Biochem.*, **1985**, *147*, 451–454.
- [330] Stadler, J.M.; Stafforst, T. Pyrene Chromophores for the Photoreversal of Psoralen Interstrand Crosslinks. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 5260–5266.
- [331] Castellano, R.K.; Craig, S.L.; Nuckolls, C.; Rebek, J.J. Detection and Mechanistic Studies of Multicomponent Assembly by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7876–7882.
- [332] Rabinkov, A.G.; Pozdnev, V.F.; Amontov, S. V.; Kopelevich, V.M.; Gunar, V.I. Biotinylation of Amines with the Pentafluorophenyl Ester of D-Biotin. *Chem. Nat. Compd.*, **1989**, *25*, 350–353.
- [333] Malakhov, A.D.; Malakhova, E.V.; Kyznitsova, S. V; Grechishnikova, I.V.; Prokhorenko, I.A.; Skorobogatyĭ, M. V; Korshun, V.A.; Berlin, Y.A.; Kuznitsova, S.V.; Grechishnikova, I.V.; Prokhorenko, I.A.; Skorobogatyĭ, M.V.; Korshun, V.A.; Berlin, Y.A. Synthesis and Fluorescent Properties of 5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-Deoxyuridine-Containing Oligodeoxynucleotides. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, **2000**, *26*, 39–50.
- [334] Schwabacher, A.W.; Lane, J.W.; Schiesher, M.W.; Leigh, K.M.; Johnson, C.W. Desymmetrization Reactions: Efficient Preparation of Unsymmetrically Substituted Linker Molecules. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 1727–1729.
- [335] Hatzakis, N.S.; Engelkamp, H.; Velonia, K.; Hofkens, J.; Christianen, P.C.M.; Svendsen, A.; Patkar, S.A.; Vind, J.; Maan, J.C.; Rowan, A.E.; Nolte, R.J.M. Synthesis and Single Enzyme Activity of a Clicked lipase–BSA Hetero-Dimer. *Chem. Commun.*, **2006**, *0*, 2012–2014.
- [336] Jung, M.E.; Kim, W.-J. Practical Syntheses of Dyes for Difference Gel Electrophoresis.

Bioorg. Med. Chem., **2006**, *14*, 92–97.

- [337] Jiang, L.-L.; Dou, L.-F.; Li, B.-L. An Efficient Approach to the Synthesis of Water-Soluble Cyanine Dyes Using Poly(ethylene Glycol) as a Soluble Support. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 5825–5829.
- [338] Chadwick, R.; Van Gyzen, S.; Liogier, S.; Adronov, A. Scalable Synthesis of Strained Cyclooctyne Derivatives. *Synthesis (Stuttg.)*, **2014**, *46*, 669–677.
- [339] Regourd, J.; Ali, A.A.-S.; Thompson, A. Synthesis and Anti-Cancer Activity of C-Ring-Functionalized Prodigiosin Analogues. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 1528–1536.
- [340] Guzaev, A.P. Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2013**; Vol. Chapter 3, p. 3.1.1-3.1.60.
- [341] Apffel, A.; Chakel, J.A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W.S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC–electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 1320–1325.
- [342] Heinrich, G.; Schoof, S.; Gusten, H. 9,10-Diphenylanthracene as a Fluorescence Quantum Yield Standard. *J. Photochem.*, **1974**, *3*, 315–320.
- [343] Zagrobelny, J.; Betts, T.A.; Bright, F. V. Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Investigations of Pyrene Excimer Formation in Supercritical CO₂. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 5249–5257.
- [344] G Martido, J.M.; S Castanheira, E.M.; Reis Sousa, A.T.; Saghbini, S.; Andre G M P, J.C.; Winnik, M.A. Polystyrene Cyclization under High Hydrostatic Pressure. *Macromolecules*, **1996**, *28*, 1167–1171.
- [345] Birks, J.B.; Dyson, D.J.; Munro, I.H. 'Excimer' Fluorescence. II. Lifetime Studies of Pyrene Solutions. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **1963**, *275*, 575–588.
- [346] Duhamel, J. New Insights in the Study of Pyrene Excimer Fluorescence to Characterize Macromolecules and Their Supramolecular Assemblies in Solution. *Langmuir*, **2012**, *28*, 6527–6538.

Приложение 1.

Последовательности ДНК-зондов, данные обращенно-фазовой ВЭЖХ и масс-спектров.

Олигонуклеотид	Последовательность, 5' → 3'	ВЭЖХ время удерживания, мин	ESI-MS, m/z	
			Теор	Практ
MB1	P1-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl	19,95	10940	10938
MB2	P1_P1-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl	23,26	11363	11361
MB3	P2_P1-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl	25,49	11377	11375
MB4	P2-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl	20,41	10954	10952
MB5	P1_P2-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl	23,49	11377	11375
MB6	P2_P2-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl	24,11	11391	11389
MB7	P1-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl_Dabeyl	24,07	11386	11384
MB8	P1_P1-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl_Dabeyl	25,87	11809	11807
MB9	P2_P1-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl_Dabeyl	26,48	11823	11821
MB10	P2-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl_Dabeyl	24,63	11400	11398
MB11	P1_P2-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl_Dabeyl	26,26	11823	11821
MB12	P2_P2-GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC-Dabeyl_Dabeyl	26,77	11837	11836
MB13	P1-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl	19,58	11229	11227
MB14	P1_P1-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl	22,80	11652	11650
MB15	P2_P1-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl	23,62	11666	11664
MB16	P2-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl	18,79	11243	11241
MB17	P1_P2-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl	22,77	11666	11664
MB18	P2_P2-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl	23,58	11680	11678
MB19	P1-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl_Dabeyl	23,81	11675	11673
MB20	P1_P1-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl_Dabeyl	25,48	12098	12096
MB21	P2_P1-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl_Dabeyl	26,13	12112	12110
MB22	P2-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl_Dabeyl	23,04	11689	11687
MB23	P1_P2-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl_Dabeyl	25,34	12112	12111
MB24	P2_P2-CCGGGGCTCATTGAAACGCATTCATTACCCCGG-Dabeyl_Dabeyl	26,00	12126	12124

Приложение 2.

Последовательности ДНК-зондов, данные обращенно-фазовой ВЭЖХ и масс-спектров.

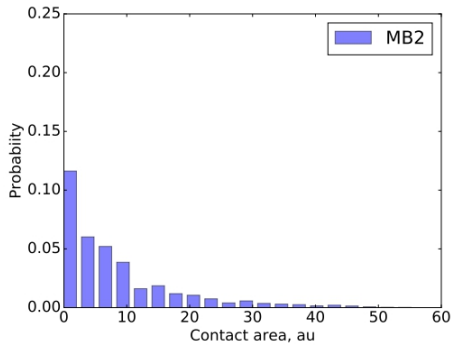
Олигонуклеотид	ВЭЖХ время удерживания, мин	ESI-MS, m/z	
		Теор	Практ
dT20-R6G	14,23	6829	6829
dT20-FAM	10,17	6748	6747
dT20-Coum 343	14,34	6730	6730
dT20-Pyr1	14,09	6692	6691
dT20-Pyr2	14,81	6706	6705
dT20-Per	17,47	6742	6742
dT20-PEPy	21,52	6835	6833
dT20-Chol	29,16	6804	6803
dT20-Biotin	10,28	6690	6689

Приложение 3.

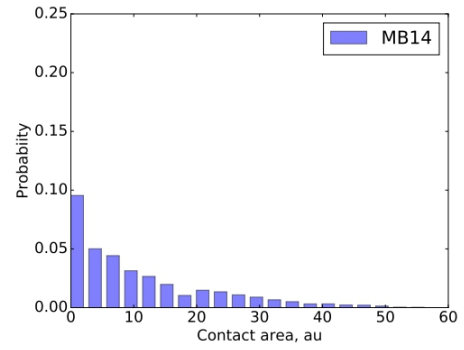
Последовательности ДНК-зондов, данные обращенно-фазовой ВЭЖХ и масс-спектров.

Олигонуклеотид		Последовательность, 5'-3'	ВЭЖХ время удерживания, мин	ESI-MS, m/z	
				Теор	Практ
8A	PEPy	AMCA-AACCCAACTGAAGCAGCA	19,59	5867	5861
	AMCA	PEPy-AACCCAACTGAAGCAGCA	22,01	6286	6282
8T	PEPy	AMCA-TACCCAACTGAAGCAGCA	19,82	5858	5852
	AMCA	PEPy-TACCCAACTGAAGCAGCA	22,01	6277	6273
8C	PEPy	AMCA-CACCCAACTGAAGCAGCA	10,38	5843	5837
	AMCA	PEPy-CACCCAACTGAAGCAGCA	21,98	6262	6258
8G	PEPy	AMCA-GACCCAACTGAAGCAGCA	10,87	5883	5877
	AMCA	PEPy-GACCCAACTGAAGCAGCA	21,90	6302	6298
10		CCGTATTATATGTTT-Dabeyl	12,79	4978	4975
11		PEPy-AAACATATAATACGG	22,56	5408	5405
12		AMCA-AAACATATAATACGG	10,41	4990	4984
13		PEPy-TTTTTTTTTTAAACATATAATACGG	21,91	8450	8446
14		AMCA-TTTTTTTTTTAAACATATAATACGG	11,05	8032	8025
15	PEPy	PEPy-CACTCTGACTACTACCTTTAAACAGAGCG-Dabeyl	21,73	10165	10159
	AMCA	AMCA-CACTCTGACTACTACCTTTAAACAGAGCG-Dabeyl	14,68	9747	9738
16	PEPy	PEPy-GGACTGCAGTCGTTGCTGTTGAAC-Dabeyl	21,84	8743 8759	8738 8754
	AMCA	AMCA-GGACTGCAGTCGTTGCTGTTGAAC-Dabeyl	15,28	8325 8341	8317 8333
17	PEPy	PEPy-CTGAGCTTTAGTGAAGGCAAATAATGCTCAG-Dabeyl	21,80	10902 10917	10896 10911
	AMCA	AMCA-CTGAGCTTTAGTGAAGGCAAATAATGCTCAG-Dabeyl	15,22	10484 10499	10475 10490
18	PEPy	PEPy-CAGCGTCTAGTGATCCCGTTATTGGC-Dabeyl	21,80	9312	9307
	AMCA	AMCA-CAGCGTCTAGTGATCCCGTTATTGGC-Dabeyl	14,80	8894	8886
19	PEPy	PEPy-TACCCAACTGAAGCAGCAACAGGGTA-Dabeyl	21,94	9341	9336
	AMCA	AMCA-TACCCAACTGAAGCAGCAACAGGGTA-Dabeyl	14,81	8923	8914
20	PEPy	PEPy-CTGAACGTGTCGGCCATCCTTTGGTT-Dabeyl	21,84	9263 9278	9258 9273
	AMCA	AMCA-CTGAACGTGTCGGCCATCCTTTGGTT-Dabeyl	14,74	8845 8860	8837 8852

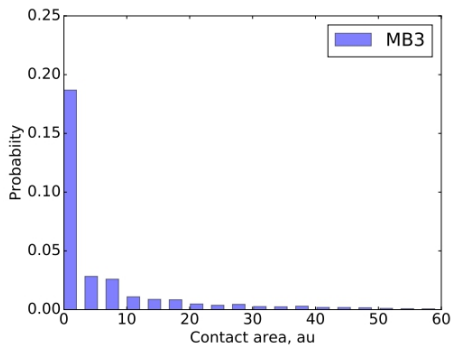
Приложение 4.



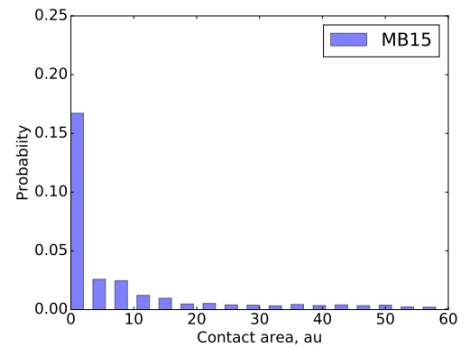
Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P1P1 в зонде MB2.



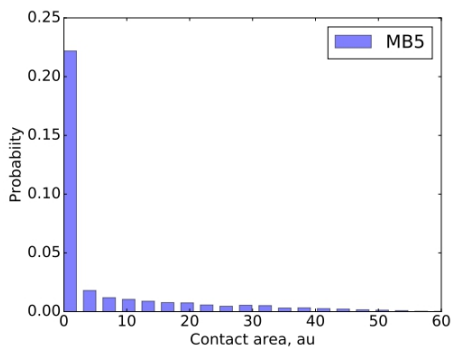
Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P1P1 в зонде MB14.



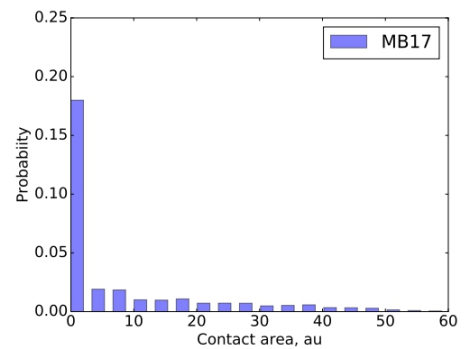
Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P2P1 в зонде MB3.



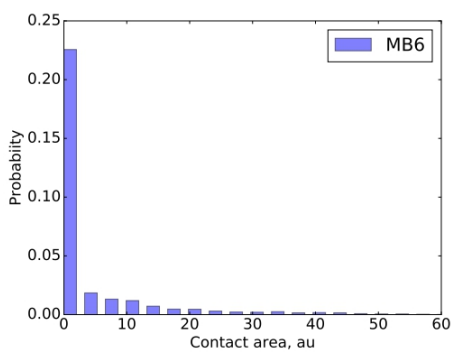
Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P2P1 в зонде MB15.



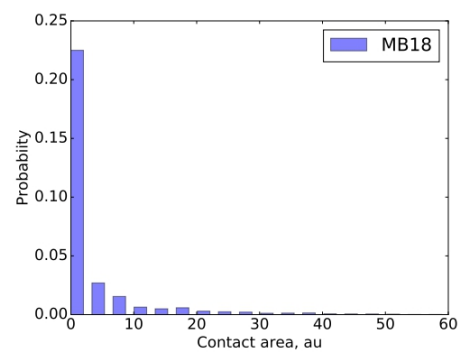
Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P1P2 в зонде MB5.



Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P1P2 в зонде MB17.



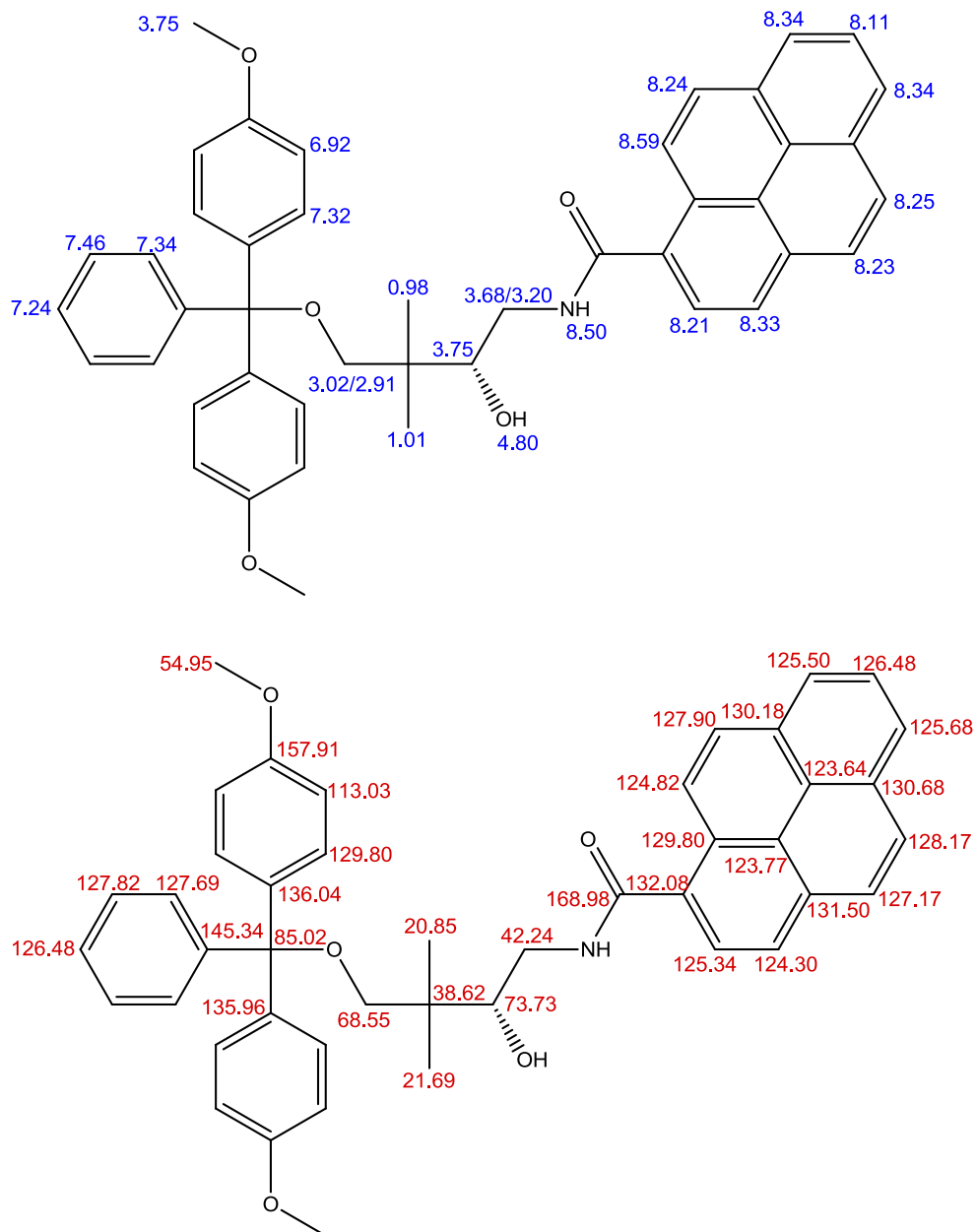
Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P2P2 в зонде MB6.



Вероятностное распределение перекрытия пиренов эксимерной метки P2P2 в зонде MB18.

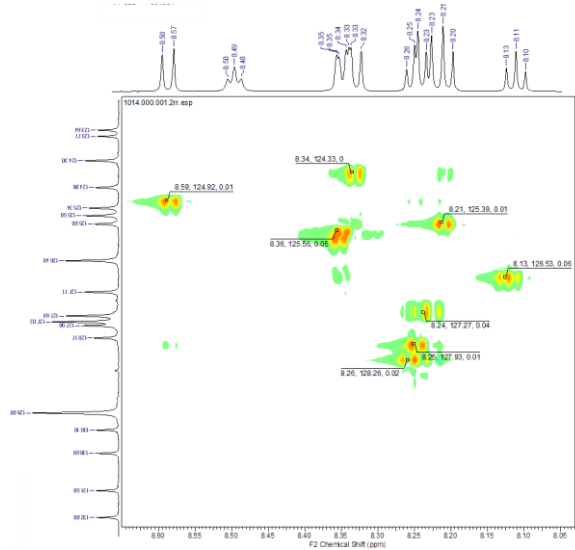
Приложение 5.

Отнесение сигналов соединения **4a** в ^1H и ^{13}C ЯМР на основе DEPT, HSQC, HMBC, COSY и NOESY спектров.

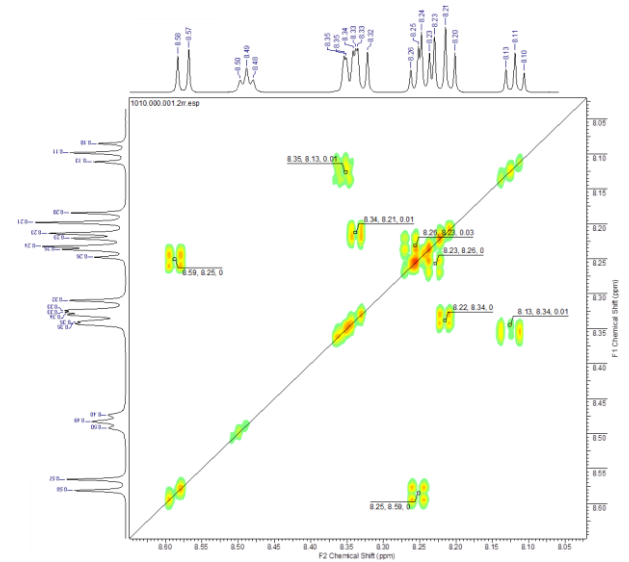


Приложение 6.

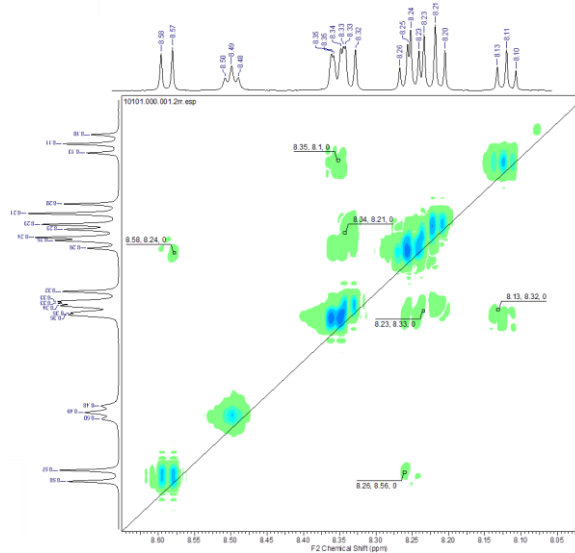
^1H , ^{13}C – HSQC, область ароматических сигналов соединения **4a**



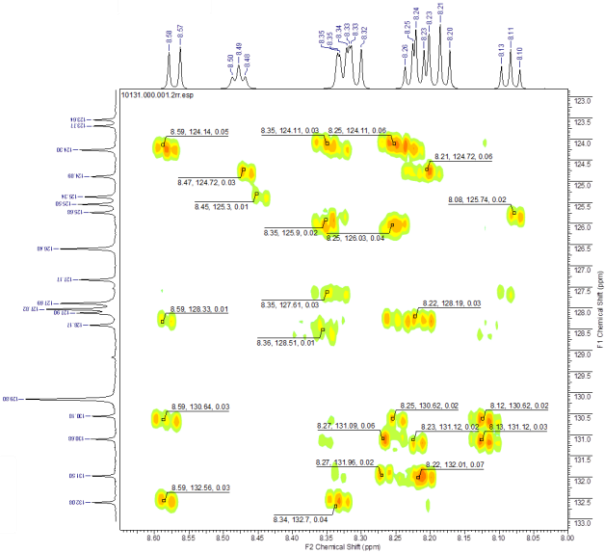
^1H , ^1H – COSY, область ароматических сигналов соединения **4a**



^1H , ^1H – NOESY, область ароматических сигналов соединения **4a**

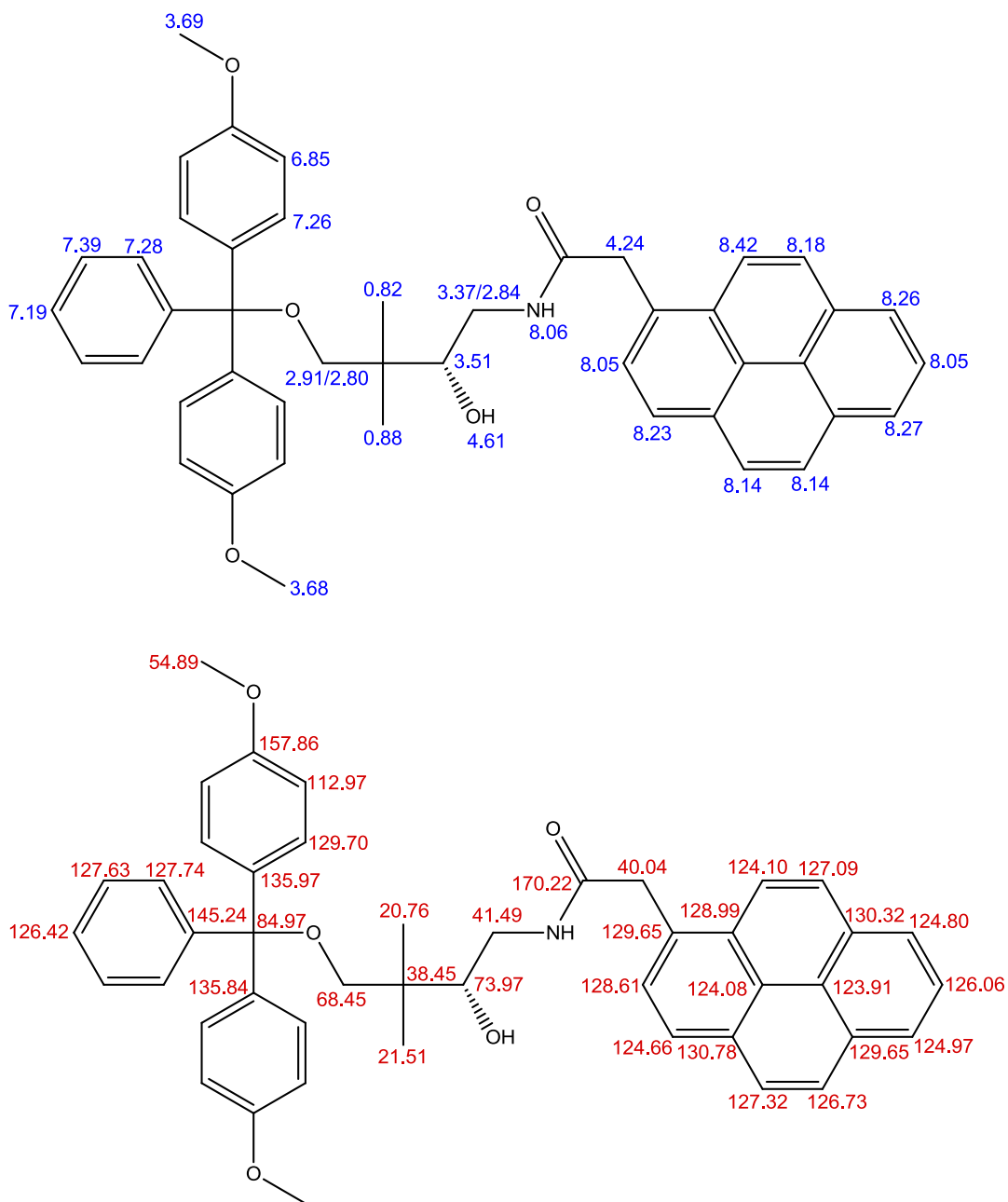


^1H , ^{13}C – HMBC, область ароматических сигналов соединения **4a**



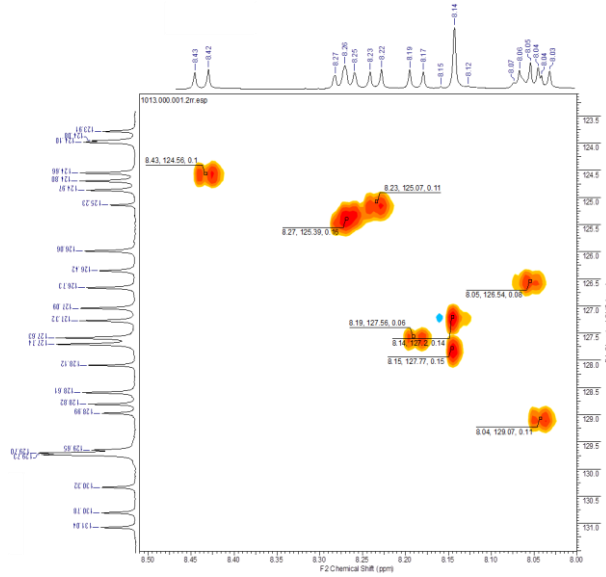
Приложение 7.

Отнесение сигналов соединения **46** в ^1H и ^{13}C ЯМР на основе DEPT, HSQC, HMBC, COSY и NOESY спектров.

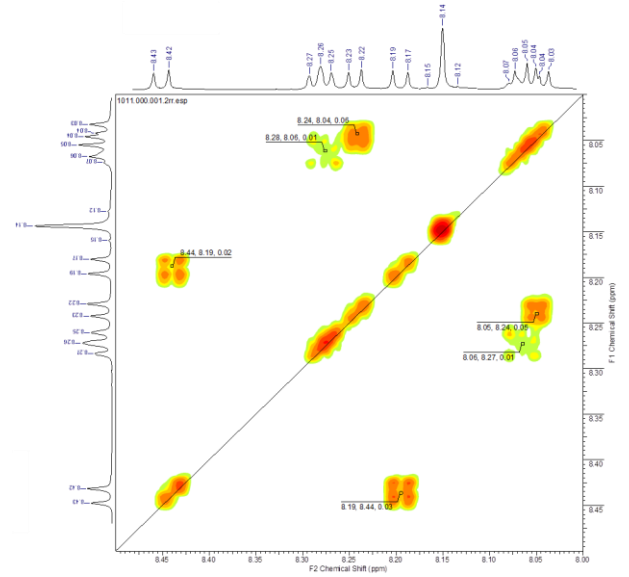


Приложение 8.

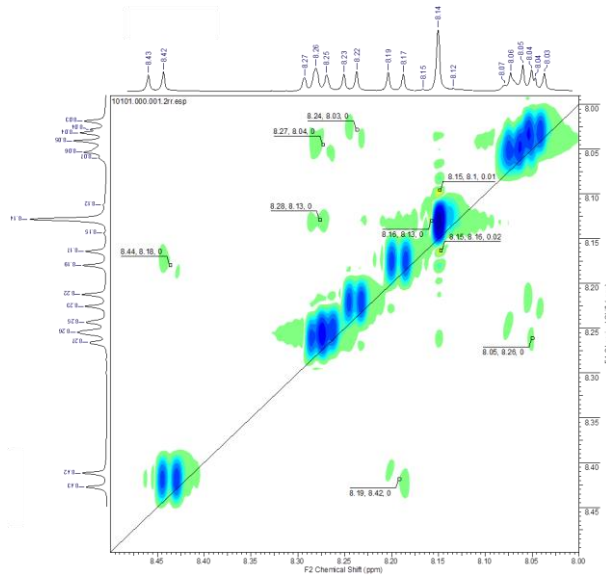
^1H , ^{13}C – HSQC, область ароматических
сигналов соединения **46**



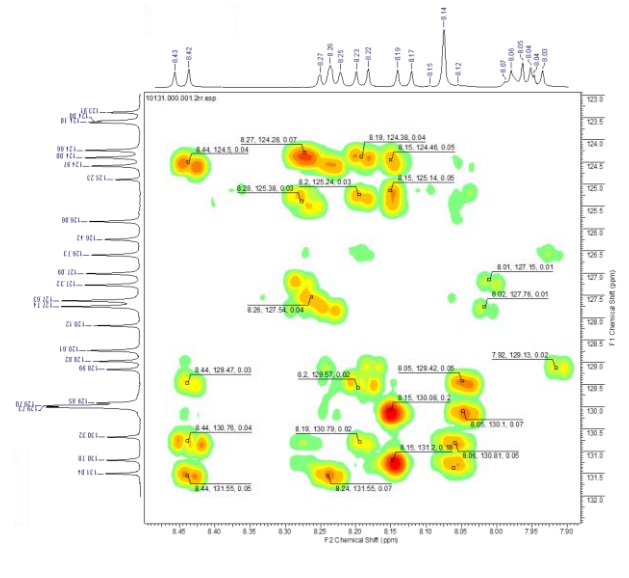
^1H , ^1H – COSY, область ароматических
сигналов соединения **46**



^1H , ^1H – NOESY, область ароматических
сигналов соединения **46**

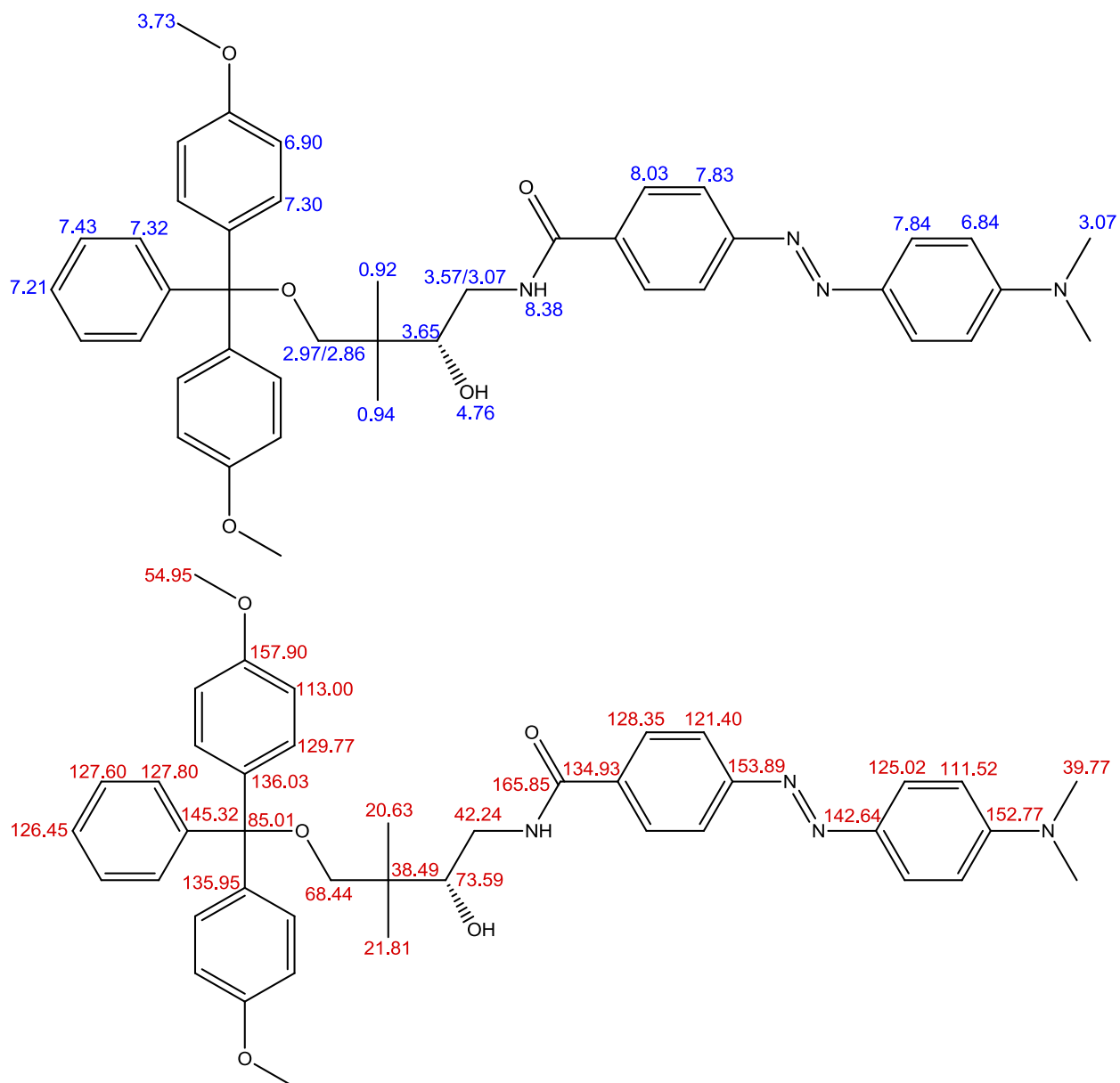


^1H , ^{13}C – HMBC, область ароматических
сигналов соединения **46**



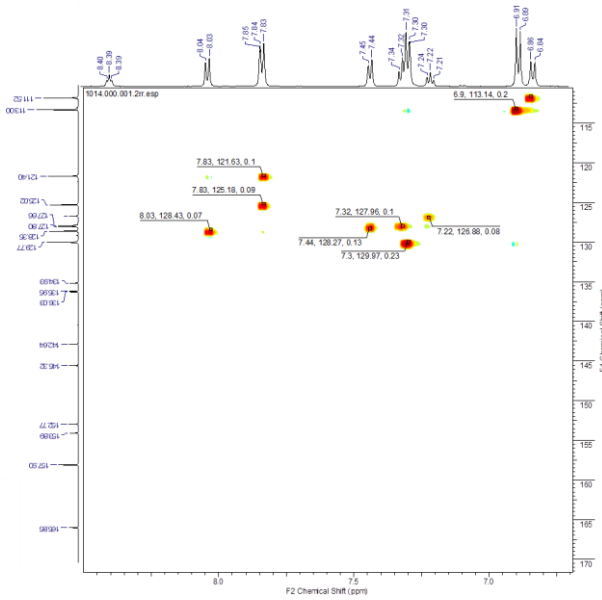
Приложение 9.

Отнесение сигналов соединения **4в** в ^1H и ^{13}C ЯМР на основе DEPT, HSQC, HMBC, COSY и NOESY спектров.

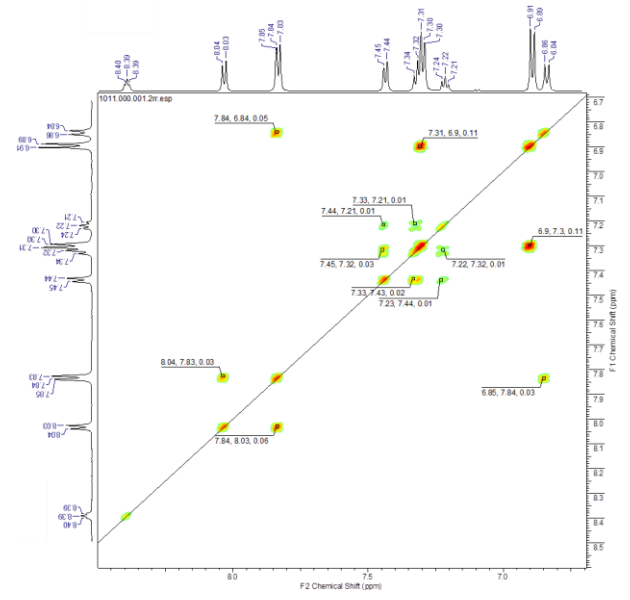


Приложение 10.

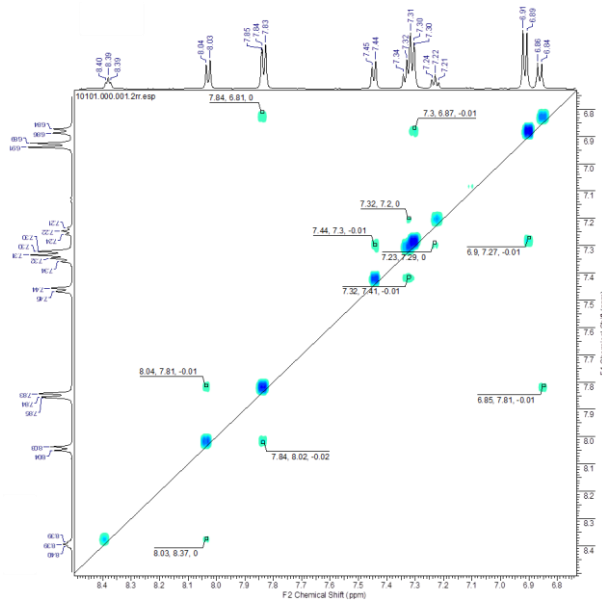
^1H , ^{13}C – HSQC, область ароматических сигналов соединения **4в**



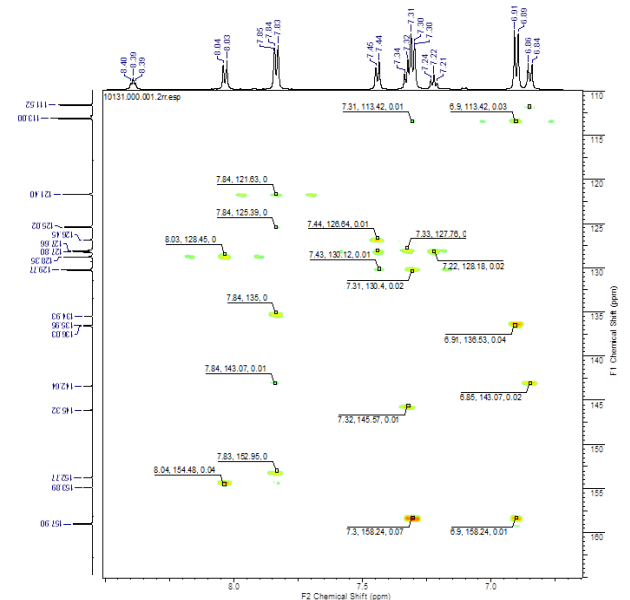
^1H , ^1H – COSY, область ароматических сигналов соединения **4в**



^1H , ^1H – NOESY, область ароматических сигналов соединения **4в**



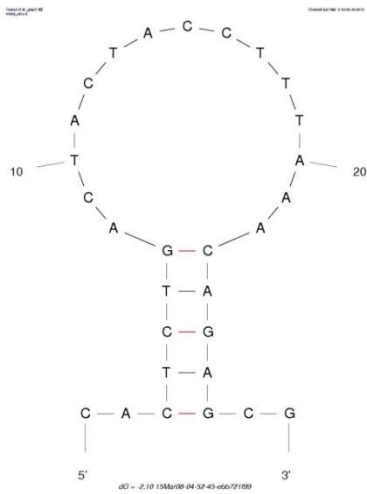
^1H , ^{13}C – HMBC, область ароматических сигналов соединения **4в**



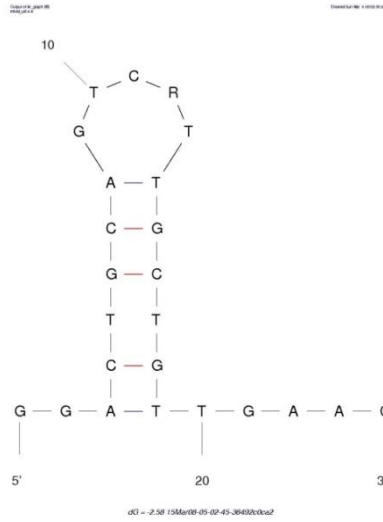
Приложение 11.

Последовательности и вторичные структуры зондов. Предсказание вторичной структуры в программе mfold.

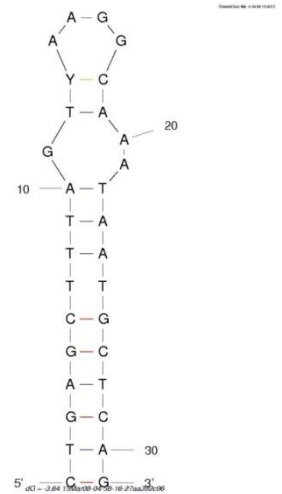
15 зонд



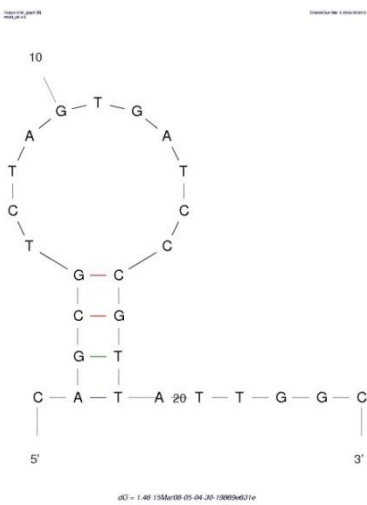
16 зонд



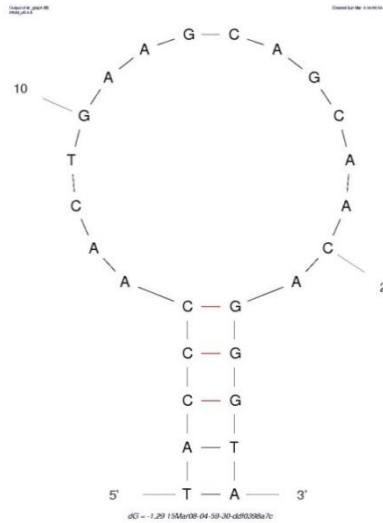
17 зонд



18 зонд



19 зонд



20 зонд

