



УДК 577.113.(3+4),547.467.3

ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ МЕЧЕНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ TaqMan С ПОМОЩЬЮ “КЛИК”-ХИМИИ ПО РЕАКЦИИ КАТАЛИЗИРУЕМОГО Cu(I) АЗИД-АЛКИНОВОГО ЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЯ (CuAAC)¹

© 2017 г. С. В. Васильева*, #, Е. А. Буракова*, Л. Г. Жданова**, ***, М. С. Анисименко**, ***, Д. А. Степенко*

*ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

**ООО “БиоЛинк”,

630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

***ФГБНУ НИИ молекулярной биологии и биофизики, 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

Поступила в редакцию 16.07.2016 г.

Принята к печати 08.08.2016 г.

Предложен метод получения олигонуклеотидных зондов TaqMan, основанный на постсинтетическом “клик”-мечении азидопроизводным флуоресцеина алкинильной боковой цепи остатков пиримидинов по реакции катализируемого Cu(I) диполярного [3 + 2]-циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC). Олигонуклеотиды, содержащие алкинильную группу, были синтезированы с использованием разработанных авторами ранее дезоксиуридинового или дезоцитидинового фосфитамидных мономеров. Были получены олигонуклеотидные зонды TaqMan, содержащие на 3'-конце гаситель флуоресценции и в различных внутренних положениях остаток флуоресцеина. Показано, что данные зонды позволяют детектировать накопление продукта в ходе ПЦР в режиме реального времени. Отмечено, что при сближении флуоресцентной метки с 3'-концом, несущим гаситель, эффективность гашения флуоресценции возрастает (уровень фоновой флуоресценции падает).

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, флуоресцентный зонд, фосфитамид.

DOI: 10.7868/S0132342317010122

ВВЕДЕНИЕ

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных зондов TaqMan широко применяется в научных и клинических целях [1].

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на конференции “Химическая биология-2016”, г. Новосибирск, 24–29 июля 2016 г.

Сокращения: ВHQ-1 – Black Hole Quencher 1, CuAAC – катализируемая Cu(I) реакция [3 + 2]-диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов, CPG – стекло с контролируемым размером пор, DMTg – 4,4'-диметокситригидрил, DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин, Flu – остаток 5-ацетил-аминофлуоресцеина, HBTU – гексафторфосфат *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурония, MALDI-TOF – времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбционной ионизацией в присутствии матрицы, TaqMan – линейные разрушаемые олигонуклеотидные зонды, ТВТА – трис[(1-бензил-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин, ТЕАА – ацетат триэтиламмония, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Автор для связи (тел.: +7 (383) 363-51-83; факс: +7 (383) 363-51-82; эл. почта: svetlana2001@gmail.com).

Наиболее распространены зонды, несущие флуорофор на 5'-конце олигонуклеотида и гаситель флуоресценции на 3'-конце. Сконструированные должным образом зонды TaqMan должны иметь низкий фон и высокое плато флуоресценции. Перемещение флуорофора или гасителя от концов к внутреннему положению в олигонуклеотиде, т.е. оптимизация расстояния между флуорофором и гасителем, приводит к снижению фоновой флуоресценции и увеличению эффективности зонда [2].

В работе предложен метод синтеза олигонуклеотидных зондов TaqMan, флуоресцентно меченных по остаткам пиримидинов внутри олигонуклеотидной цепи, с использованием реакции катализируемого Cu(I) диполярного [3 + 2]-циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC). Олигонуклеотиды для синтеза зондов содержали гаситель флуоресценции ВHQ-1 на 3'-конце и алкинированные остатки тимидина или дезоцитидина во внутренних положениях цепи, для

Таблица 1. Последовательности использованных в работе праймеров и зондов и выходы полученных алкинилированных олигонуклеотидов.

Кодировка	Последовательность олигонуклеотида, 5'–3' ^a	Выход, % ^b
BCR-Z	<u>T</u> CCATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	32.3
BCR-Z1	TCCATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	35.8
BCR-Z2	TCCATCTCGC*TCATCATCACCGACA-BHQ-1	33.0
BCR-Z3	TCC*ATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	36.2
BCR-Z4	U*CCATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	34.6
BCR-Z5	TCCATCU*CGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	38.9
BCR-Z6	TCCATCTCGCU*CATCATCACCGACA-BHQ-1	36.6
BCR-F	GATGGTGGGAGACTCACTCG	–
BCR-R	GCCTGCGATGGCGTTCA	–

^a Олигонуклеотид **BCR-Z** содержит 5'-концевой остаток 5-(3-амино-1-пропенил)-2'-дезоксисуридина (**I**); звездочкой отмечены модифицированные алкинильными группами остатки пиримидинов (см. соответствующие исходные для синтеза – **I**) и (**II**).

^b Выход определялся спектрофотометрически, исходя из оптической плотности водных растворов олигонуклеотидов, очищенных на картриджах POLY-PAK (Glen Research, США), зарегистрированной при длине волны 260 нм; приведены усредненные значения для двух синтезов.

введения которых в ходе синтеза олигонуклеотидов использовали разработанные ранее авторами

фосфитамидные мономеры на основе дезоксиуридина (**I**) и дезоксицитидина (**II**) [3] (схема 1).

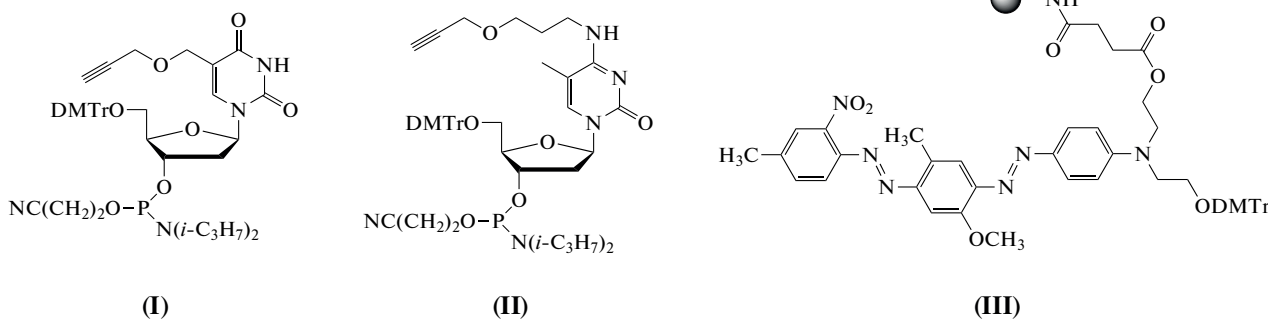


Схема 1. Структуры амидофосфитных мономеров – аналогов дезоксиуридина (**I**) и дезоксицитидина (**II**) для автоматизированного твердофазного синтеза алкинилсодержащих олигонуклеотидов. Структура использованного в работе CPG-носителя с привитым гасителем флуоресценции BHQ-1 для введения его по 3'-концу олигонуклеотидов (**III**).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За последние годы приобрели большую популярность методы “клик”-химии, основными принципами которой являются высокий выход целевого продукта и мягкие условия реакции [4]. Одним из наиболее широко используемых методов “клик”-химии служит катализируемая Cu(I) реакция [3 + 2]-диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC) [5, 6]. Эта реакция была использована для постсинтетического мечення олигонуклеотидов остатками флуорофоров, например, перилена [7].

В данной работе мы адаптировали методику “клик”-химии, основанную на катализируемой Cu(I) реакции циклоприсоединения азидов и ал-

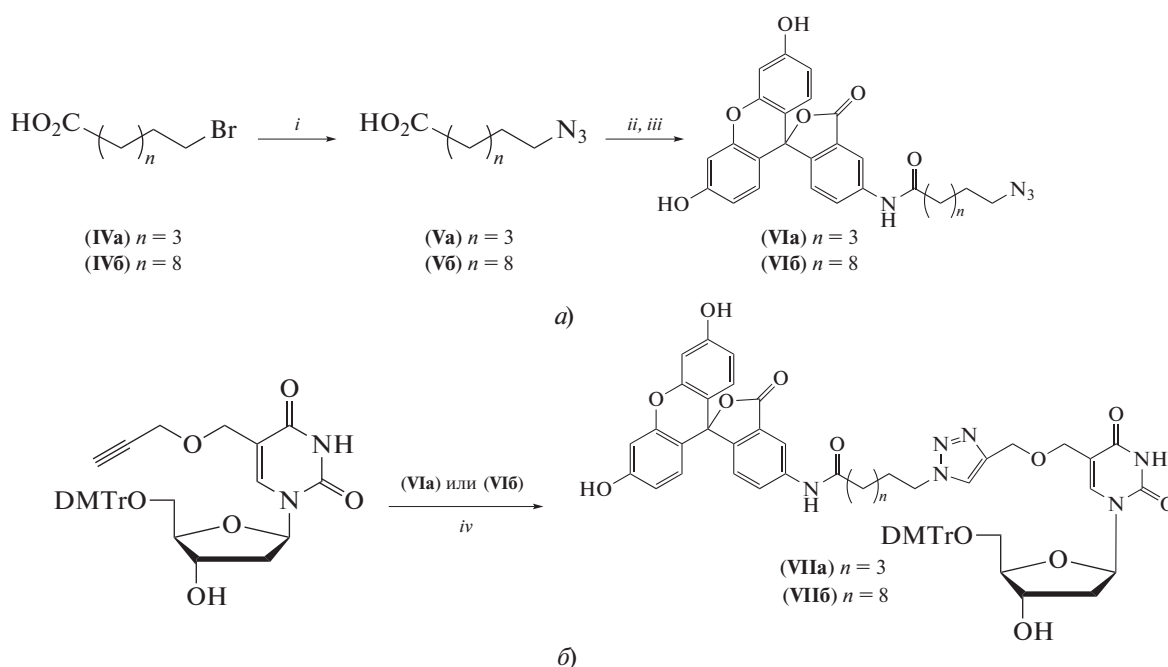
кинов (CuAAC), к постсинтетическому мечению олигонуклеотидов, алкинированных по остатку пиримидинового нуклеозида во внутреннем положении цепи, с помощью азидопроизводных флуоресцеина.

Синтез олигонуклеотидов, содержащих остаток гасителя флуоресценции BHQ-1 на 3'-конце (см. схему 1, **III**) и алкинильную группу в середине цепи проводился с использованием модифицированных алкинильными группами фосфитамидных мономеров на основе дезоксиуридина (**I**) и дезоксицитидина (**II**) [3] (схема 1) на 8-колоночном синтезаторе ASM-800, что позволяло сравнивать эффективность включения модифициро-

ванных мономеров. Последовательности и выходы олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

Для получения зондов TaqMan проводилось постсинтетическое флуоресцентное мечение олигонуклеотидов, модифицированных алки-

нильными группами, с помощью азидопроизводных флуоресцеина, которые были получены путем ацилирования 5-аминофлуоресцеина азидокислотами (схема 2).



i) NaN₃, DMSO; *ii)* HBTU, DIPEA, DMSO; *iii)* 5-аминофлуоресцеин, DMSO; *iv)* CuSO₄, Na-аскорбат, TBTA, водн. DMSO.

Схема 2. Синтез азидопроизводных флуоресцеина и их апробация в “клик”-реакции с 5-алкинильными нуклеозидами. *a)* Синтез азидопроизводных флуоресцеина: 5-(6-азидогексаноиламино)флуоресцеина (**VIa**) и 5-(11-азидоундеканоилаго)флуоресцеина (**VIb**). *б)* Реакция катализируемого Cu(I) диполярного [3 + 2]-циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC) с 5-алкинильным производным дезоксиуридина для оптимизации условий “клик”-мечения зондов TaqMan.

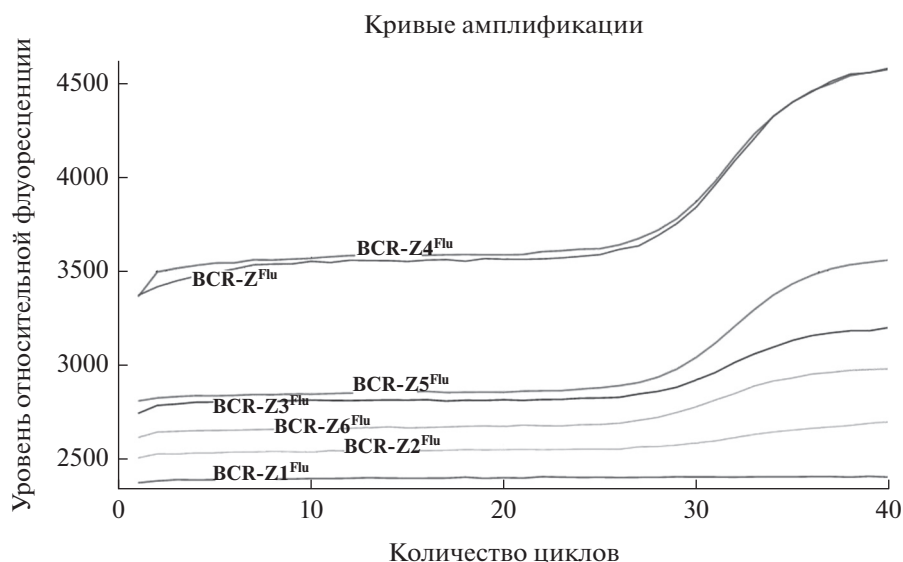
Для этого по методике [8] были получены 6-азидогексановая (**Va**) и 11-азидоундекановая (**Vb**) кислоты (схема 2, *a*). Ацилирование 5-аминофлуоресцеина проводили по стандартной методике [9]: кислоты активировали с помощью HBTU в присутствии DIPEA и полученные активированные эфиры без предварительной очистки вводили в реакцию ацилирования 5-аминофлуоресцеина. Так были получены 5-(6-азидогексаноиламино)флуоресцеин (**VIa**) и 5-(11-азидоундеканоилаго)флуоресцеин (**VIb**) (схема 2*a*).

Условия реакции CuAAC [5] были оптимизированы применением алкинилированного нуклеозида 5'-O-DMTr-5-пропаргилосиметил-2'-дезоксидеоксиуридина и азидов (**VIa**) и (**VIb**). Нуклеозидные производные (**VIIa**) и (**VIIb**) были получены с выходами 85–90% (схема 2*b*).

Оптимизированная методика реакции CuAAC была применена для флуоресцентного мечения алкинилированных олигонуклеотидов с использованием азидов (**VIb**). Синтезированные флуорес-

центные олигонуклеотидные зонды, содержащие в своем составе одновременно ВНQ-1 на 3'-конце и остаток флуоресцеина внутри цепи, имели не только разную электрофоретическую подвижность, но и разную окраску. Это позволило легко идентифицировать и разделять продукты. Полученные путем гель-электрофореза продукты (табл. 2) были очищены от водорастворимых компонентов полиакриламидного геля и охарактеризованы при помощи электронных спектров поглощения. Спектры поглощения олигонуклеотидных зондов, содержавших, кроме ВНQ-1 остаток флуоресцеина (отмеченный в табл. 2 пометкой “Flu”), имели сигналы при 495 и 535 нм, характерные для флуоресцеина и ВНQ-1 соответственно, что согласуется с литературными данными [10, 11].

Синтезированные по реакции CuAAC зонды TaqMan были подвергнуты очистке с помощью



Кривые ПЦР-амплификации с использованием полученных зондов TaqMan.

гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующей обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выходы полученных после электрофореза продуктов составили 30–40%. Последовательности и молекулярные массы для зондов, определенные методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, приведены в табл. 2.

ПЦР в режиме реального времени осуществляли на приборе CFX (Bio-Rad, США). Структуры праймеров и зондов, использованных для ПЦР, представлены в табл. 1 и 2. Результаты

ПЦР-амплификации приведены на рисунке и в табл. 3.

Результаты ПЦР показали, что по мере приближения флуорофора к гасителю в молекуле зонда от **BCR-Z4** до **BCR-Z1** снижается уровень фоновой флуоресценции с 3600 до 2400 единиц (рисунок). Однако приближение флуорофора к 3'-концу зонда, вероятно, может создавать пространственные затруднения для эффективной гибридизации зонда с матрицей ДНК, что выражается в одновременном снижении разности между уровнем флуорес-

Таблица 2. Последовательности, молекулярные массы и выходы очищенных олигонуклеотидов и зондов TaqMan

Кодировка ^a	Последовательность олигонуклеотида, 5'–3' ^b	Выход, %	Молекулярная масса ^c	
			эксп. [M + H] ⁺	расч. [M + H] ⁺
BCR-Z2	TCCATCTCGC*TCATCATCACCGACA-BHQ-1	—	8150.54	8147.50
BCR-Z5	TCCATCU*CGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	—	8097.81	8097.39
BCR-Z^{Flu}	T^{Flu} CCATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	—	—	—
BCR-Z1^{Flu}	TCCATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	13.5	8704.13	8704.10
BCR-Z2^{Flu}	TCCATCTCGC ^{Flu} TCATCATCACCGACA-BHQ-1	15.6	8704.55	8704.10
BCR-Z3^{Flu}	TCC ^{Flu} ATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	14.9	8710.15 ^e	8710.10
BCR-Z4^{Flu}	U^{Flu} CCATCTCGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	12.7	8661.87 ^d	8660.6
BCR-Z5^{Flu}	TCCATCU ^{Flu} CGCTCATCATCACCGACA-BHQ-1	12.5	8648.75	8648.0
BCR-Z6^{Flu}	TCCATCTCGCU ^{Flu} CATCATCACCGACA-BHQ-1	12.2	8655.72 ^e	8654.6

^a Flu-остаток флуоресцеина; ^b звездочкой отмечены модифицированные алкильными группами остатки пиримидинов; олигонуклеотид **BCR-Z^{Flu}** был помечен флуоресцеином путем постсинтетического ацилирования аминогруппы на линкере по 5-положению тимидина активированным эфиром 5(6)-карбоксифлуоресцеина; **T^{Flu}**, **C^{Flu}**, **U^{Flu}** — остатки пиримидинов, меченые флуоресцеином; ^c по данным масс-спектрологии MALDI-TOF (см. Экспериментальную часть); ^d [M + Li]⁺; ^e [M + 2Li]⁺.

Таблица 3. Изменение уровня флуоресценции в ходе ПЦР с использованием полученных зондов TaqMan

Кодировка	Уровень фоновой флуоресценции, отн. ед.	Уровень флуоресценции в области плато, отн. ед.	Разность уровней флуоресценции в области плато и фоновой флуоресценции, отн. ед.
BCR-Z	3600	4600	1000
BCR-Z1	2400	2400	0
BCR-Z2	2500	2700	200
BCR-Z3	2800	3200	400
BCR-Z4	3600	4600	1000
BCR-Z5	2800	3600	800
BCR-Z6	2700	3000	300

ценции в области плато и уровнем фоновой флуоресценции с 1000 единиц до нуля. В этой связи можно предположить, что оптимальное расстояние между флуорофором и гасителем должно быть достаточным для образования устойчивого дуплекса с матрицей и обеспечивать эффективную ПЦР.

Таким образом, было показано, что зонды TaqMan, содержащие остатки гасителя ВНQ-1 на 3'-конце и остатки флуоресцеина внутри цепи, введенного по реакции катализируемого Cu(I) циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC) с использованием специально созданных фосфитаминов на основе пиримидиновых нуклеозидов, позволяют детектировать накопление продукта амплификации в ходе ПЦР в режиме реального времени. С уменьшением расстояния между флуоресцентным красителем и гасителем флуоресценция в пределах зонда закономерно снижается уровень фоновой флуоресценции. Это обстоятельство может быть полезно при использовании зондов, имеющих большую длину и требующих пространственного сближения флуорофора и гасителя для более эффективного гашения флуоресценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен метод получения олигонуклеотидных зондов TaqMan, основанный на постсинтетическом "клик"-мечении азидопроизводным флуоресцеина алкинильной боковой цепи остатков пиримидинов по реакции катализируемого Cu(I) диполярного [3 + 2]-циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC). Для введения алкинированных мономеров в целевую последовательность олигонуклеотидов были использованы алкинированные фосфитаминовые производные дезоксиуридина и дезоксицитидина, предложенные авторами ранее. Как было показано, данные мономерные звенья встраиваются в олигонуклеотидную цепь с высоким выходом и

эффективно взаимодействуют с азидами постсинтетически по реакции CuAAC. Были получены олигонуклеотидные зонды TaqMan, содержащие на 3'-конце гаситель флуоресценции и остаток флуоресцеина во внутренних положениях олигонуклеотидной цепи, на разном расстоянии от гасителя. Выходы полученных продуктов практически не зависели от положения метки в олигонуклеотиде и были сравнимы или превышали достигнутые в опубликованных работах в данной области [2, 12, 13]. Показано, что полученные в работе зонды TaqMan позволяют успешно детектировать накопление продукта в ходе ПЦР в режиме реального времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все реагенты и растворители были приобретены у соответствующих коммерческих поставщиков и использованы без дальнейшей очистки, если это не оговорено отдельно. 11-Бромундекановая кислота, *N,N*-диизопропилэтиламин (DIPEA), 5-аминофлуоресцеин, трис[(1-бензил-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин (TBTA) были приобретены у компании "Sigma-Aldrich" (США), 6-бромгексановая кислота – у фирмы "Alfa Aesar" (США), азид натрия – у фирмы "Serva" (ФРГ), β-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилдиамидофосфит – у фирмы "Fluka" (Швейцария), 4,4'-диметокситриэтилхлорид и 1,2,4-триазол – у фирмы "Chem-IMPEx" (США), гексафторфосфат *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуриония (НВТУ) – у фирмы "ChemPer" (США). Растворители и остальные химические реактивы были отечественного производства квалификации "х.ч.", "ч.д.а." или "о.с.ч.", очищенные при необходимости по стандартным методикам.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Милихром А02 компании "Эконова" (Россия) на колонке 2.0 × 75 мм с носителем ProntoSIL-120-5-C18 AQ DB-2003 5.0 μm (Bischoff Leonberg, ФРГ) с элюцией градиентом ацетонитрила 0–80%

в 0.1 М ТЕАА при скорости потока 0.2 мл/мин. Для колоночной хроматографии использовали силикагель MN Kieselgel 60 (0.04–0.063 мкм, “Macherey Nagel”, ФРГ). Для ТСХ применяли пластинки TLC Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (“Merck”, ФРГ).

Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) для растворов веществ в CD₃OD (где не указано особо) регистрировали на спектрометрах Bruker AV-400 и Bruker AV-300 с мощностью прибора 400 и 300 МГц соответственно (Bruker Daltonics, ФРГ) в Центре анализа органических соединений и матриалов коллективного пользования Института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук. Для спектров ЯМР на ядрах ¹H и ¹³C использовали тетраметилсилан в качестве внутреннего стандарта, для спектров ЯМР ³¹P в качестве внешнего стандарта использовали 85% H₃PO₄ в D₂O. Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF на приборе Bruker Reflex III Autoflex Speed (Bruker Daltonics, ФРГ) в варианте положительных ионов с использованием 3-гидроксипиколиновой кислоты в качестве матрицы. ИК-спектры были записаны на спектрометре Specord M40 (Karl Zeiss Jena, ФРГ).

Синтез олигонуклеотидов проводили с помощью автоматического синтезатора ДНК ASM-800 компании “Биоссет” (Новосибирск, Россия) по стандартному фосфитаминому протоколу. Для синтеза олигонуклеотидов, содержащих на 3'-конце гаситель флуоресценции ВНQ-1, использовали СРG-носитель (схема 1, (III)), любезно предоставленный А.Н. Синяковым (ИХБФМ СО РАН). Для введения модифицированных остатков дезоксиуридина или дезоксицитидина увеличивали время конденсации соответствующего фосфитамида (схема 1, (I) и (II)) с 40 с до 3 мин.

Фосфитамидные мономеры 5-пропаргилокси-метил-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-3'-(β -цианэтоксиди-*N,N*-диизопропиламинофосфинил)-2'-дезоксисуридин (I) и N⁴-(3-пропаргилоксипропил)-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-3'-(β -цианэтоксиди-*N,N*-диизопропиламинофосфинил)-2'-дезоксидитидин (II) были получены по ранее описанным методикам [3].

Общая методика синтеза азидокислот. 6-Азидогексановая кислота (Va) и 11-азидоундекановая кислота (Vb) были получены по модифицированной методике [8] из соответствующих ω -бромкислот (IVa–b) (схема 2a). Остатки DMSO в конечном продукте удаляли упариванием с бутилацетатом, что позволило повысить выход кислот (Va) и (Vb) с 74 до 89% для (Va) [8]. Вместо DMSO может быть использован DMF, после удаления остатков которого упариванием конечного продукта при 56°C выходы (Va) и (Vb) составили 78 и 80% соответственно. Спектральные характе-

ристики кислоты (Va) соответствуют литературным [8]. Кислота (Vb): ¹H-ЯМР (CDCl₃): 3.27 (т, 2H, CH₂N₃), 2.37 (т, 2H, CH₂CO₂H), 1.65 (м, 4H, CH₂CH₂(CH₂)₆CH₂CH₂), 1.43 (м, 12H, CH₂CH₂(CH₂)₆CH₂CH₂); ¹³C ЯМР (CDCl₃): 179.88 (C=O), 51.49 (CH₂N₃), 33.99 (CH₂CO₂H), 29.37–29.01 ((CH₂)₅CH₂CH₂COOH), 28.8 (CH₂CH₂N₃), 26.4 (CH₂CH₂CH₂N₃), 24.6 (CH₂CH₂CO₂H). ИК-спектр: N₃-группа 2090 см⁻¹.

Общая методика получения 5-флуоресцеинамидов азидокислот (VIa, б). 5-(6-Азидогексаноил-амино)флуоресцеин (VIa) и 5-(11-азидоундеканоил-амино)флуоресцеин (VIб) были приготовлены по общей методике [9] с использованием активированных эфиров без предварительной очистки. Азидокислоту (Va) или (Vb) (1 ммоль) и гексафторфосфат *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурония (HBTU) (0.9 ммоль) растворяли в 2 мл DMSO, добавляли *N,N*-диизопропилэтил-амин (DIPEA) (2 ммоль) и перемешивали 15 мин при комнатной температуре. После этого добавляли 5-аминофлуоресцеин (0.5 ммоль), затем DIPEA до pH 9 и оставляли при перемешивании на 12 ч. Полноту протекания реакции контролировали методом ВЭЖХ. Реакционную смесь упаривали, остаточные количества DMSO удаляли упариванием с бутилацетатом, остаток суспендировали в CH₂Cl₂ и хроматографировали на силикагеле. Продукт элюировали в градиенте MeOH в CH₂Cl₂ 0–10% с 0.1% TFA. Упаривали целевые фракции с R_f 0.57 (VIa) и 0.63 (VIб) по ТСХ в системе CH₂Cl₂–MeOH (9 : 1) с 1% AcOH. Выходы азидов (VIa) и (VIб) составили 61 и 43% соответственно. **Азид (VIa).** ¹H-ЯМР: 8.32 (д, 1H, Flu4, J 1.77), 7.85–7.83 (дд, 1H, Flu6, J 1.95, 8.30), 7.14–7.12 (дд, 1H, Flu7, J_1 8.39, J_2 0.45), 6.67 (д, 2H, Flu4',5', J 2.32), 6.62–6.59 (д, 2H, Flu1',3', J 6.57), 6.54–6.51 (д, 2H, Flu7',2', J 2.40, J 8.76), 3.27 (т, 2H, CH₂N₃, J 6.90), 2.47–2.44 (т, 2H, CH₂C(O)NH, J 2.40), 2.00–1.57 (м, 6H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂). ¹³C-ЯМР: 171.64 (HN–C=O), 169.43 (C=O (Flu)), 159.51 (C–O–C (Flu)) 152.31 (2 C–OH (Flu)), 139.99 (C=C–NH–, C=C–C=O (Flu)), 128.31 (3–CH=C (Flu)), 127.19 (2 C=C–O (Flu), C=C–C=O (Flu)), 126.23 (C=CH–C–NH (Flu)), 123.86 (O=C–C–CH= (Flu)), 111.76 (2 HO–C–CH= (Flu)), 101.67 (2 HO–C=CH–O (Flu)), 72.29 (–C–O (Flu)), 50.44 (CH₂N₃), 32.89 (CH₂COOH), 27.81 (CH₂CH₂N₃), 25.56 (CH₂CH₂CH₂N₃), 24.37 (CH₂CH₂COOH). ИК-спектр: N₃-группа 2090 см⁻¹. MALDI-TOF: $[M + H]^+$ 487.24, вычислено для C₂₆H₂₂N₄O₆ $[M]$ 486.48. **Азид (VIб).** ¹H-ЯМР: 8.32 (д, 1H, Flu4, J 1.73), 7.85–7.83 (дд, 1H, Flu6, J 2.00, J 8.35), 7.15–7.13 (д, 1H, Flu7, J 8.3), 6.67 (д, 2H, Flu4',5', J 2.4), 6.62–6.60 (д, 2H, Flu1',3', J 8.7), 6.54–6.52 (д, 2H, Flu7',2', J 2.40, J 8.63), 3.27 (т, 2H, CH₂N₃, J 6.8),

2.45–2.41 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$, J 7.5), 1.86–1.82 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 1.65 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.43 (м, 12H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.75–1.63 (м, 6H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2$), 1.61–1.54 (м, 6H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{13}C -ЯМР: 173.70 (HN–C=O), 172.13 (C=O (Flu)), 159.51 (C–O–C (Flu)) 152.77 (2 C–OH (Flu)), 140.49 (C=C–NH–, C=C–C=O (Flu)), 128.77 (3–CH=C (Flu)), 127.85 (2 C=C–O (Flu), C=C–C=O (Flu)), 126.70 (C=CH–C–NH (Flu)), 124.31 (O=C–C–CH= (Flu)), 110.12 (2 HO–C–CH= (Flu)), 102.14 (2 HO–C=CH–O (Flu)), 72.75 (–C–O (Flu)), 51.05 (CH_2N_3), 33.35 (CH_2COOH), 29.13–28.1 ($(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 28.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 26.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 24.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). ИК-спектр: N_3 -группа 2090 cm^{-1} . MALDI-TOF: $[M + H]^+$ 557.41, вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6$ [M] 556.23.

Оптимизация катализируемого Cu(I) диполярно-го [3 + 2]-циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC) на примере 5-пропаргиллоксиметил-5'-O-(4,4'-диметокситригил)-2'-дезоксигуанидина и азидов (VIa) и (VIб). Пентагидрат сульфата меди(II) (576 мкл 50 mM раствора в смеси DMSO–вода, 99.55 : 0.45, 28.8 мкмоль), ТВТА (576 мкл 50 mM раствора в DMSO, 28.8 мкмоль) и 250 мкл 1 M ТЕАА, pH 7.0 добавляли при перемешивании к смеси растворов нуклеозида (450 мкл 50 mM раствора в воде, 22.5 мкмоль) и азиды (VIa) или (VIб) (403 мкл 100 mM раствор в DMSO, 40.3 мкмоль). Затем в реакционную смесь добавляли аскорбиновую кислоту (806 мкл свежеприготовленного 0.1 M раствора в воде, 80.6 мкмоль). Суспензию дегазировали аргоном и перемешивали 18 ч. Анализ реакционных смесей проводили методом ТСХ в системе CH_2Cl_2 –MeOH–гексан (27 : 3 : 1) с 1% AcOH: R_f 0.21 (VIIa); 0.54 (VIIб). После исчезновения в реакционной смеси исходного соединения реакционную смесь упаривали. Очистку целевых соединений проводили с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя продукт в градиенте метанола (0–20%) в смеси CH_2Cl_2 –гексан (27 : 1) с 1% AcOH. После упаривания целевых фракций получали 15 мг (85%) продукта (VIIa) и 18 мг (90%) продукта (VIIб). **Нуклеозид (VIIa).** ^1H ЯМР: 8.35 (м, 1H, Flu4), 8.11–8.01 (м, 2H, Flu6, H6 урацил), 7.82–7.80 (м, 1H, H5 триазол), 7.16–7.14 (д, 1H, Flu7, J 8.35), 6.70–6.64 (м, 4H, Flu1',3',4',5'), 6.56–6.54 (д, 2H, Flu7',2', J 8.76), 6.27 (т, 1H, 1', J 6.6), 4.62 (уш. с, 4H, триазол– CH_2 –O– CH_2 –), 4.46–4.39 (м, 3H, H4', триазол– CH_2 – CH_2 – CH_2 –), 3.92 (м, 1H, H3'), 3.82–3.7 (м, 2H, H5'), 2.46–2.43 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$, J 7.0), 2.27–2.25 (м, 2H, H2'), 2.00–1.57 (м, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{13}C ЯМР 173.30 (HN–C=O, C4 урацил), 167.92 (C=O (Flu)), 140.70 (C–O–C (Flu)), 140.67 (2 C–OH (Flu), C2 урацил), триа-

зол), 132.16 (C=C–NH–, триазол), 130.97 (C=C–C=O (Flu), C6 урацил), 129.06 (C5 урацил), (128.57 (3–CH=C (Flu)), 128.47 (2 C=C–O (Flu), C=C–C=O (Flu), C=CH–C–NH (Flu), O=C–C–CH= (Flu)), 110.57 (2 HO–C–CH= (Flu)), 102.20 (2 HO–C=CH–O (Flu)), 89.99 (C4'), 87.77 (–C–O (Flu)), 87.61 (триазол– CH_2 –O– CH_2 –), 85.21 (C1'), 70.79 (триазол– CH_2 –O– CH_2 –), 64.38 (C3'), 61.38 (C5'), 49.82 (CH_2 -триазол), 36.20 (C2'), 32.89 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 27.81 (CH_2CH_2 -триазол), 25.56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -триазол), 24.37 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$). ИК-спектр: нет полосы N_3 при 2090 cm^{-1} . MALDI-TOF: $[M + H]^+$ 783.25, вычислено для $\text{C}_{39}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_{12}$ [M] 782.25.

Нуклеозид (VIIб). ^1H -ЯМР: 8.33 (уш. с, 1H, Flu4), 8.1 (с, 1H, H6 урацил), 8.0–7.98 (м, 1H, H5 триазол), 7.86–7.84 (дд, H, Flu6, J 8.1, J 1.66), 7.17–7.15 (д, 1H, Flu7, J 8.5), 6.80–6.78 (д, 2H, 4',5', J 8.9), 6.67 (д, 2H, Flu1',3', J 2.1), 6.58–6.56 (дд, 2H, Flu7',2', J 8.9, J 2.1), 6.29–6.25 (т, 1H, 1', J 6.6), 4.63 (уш. с, 2H, триазол– CH_2 –O– CH_2 –), 4.42–4.36 (м, 3H, 4', триазол– CH_2 –O– CH_2 –), 4.30–4.27 (м, 2H, триазол– CH_2 – CH_2 – CH_2 –) 3.92 (м, 1H, 3'H), 3.82–3.71 (м, 2H, 5'H), 2.46–2.41 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$, J 7.4), 2.27–2.22 (м, 2H, 2'H), 2.00–1.57 (м, 16H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2$). ^{13}C ЯМР: 173.70 (HN–C=O), 169.02 (C=O (Flu)), 163.77 C4 урацил), C–O–C (Flu)), 154.42 (2 C–OH (Flu)), 150.73 (C2 урацил), 144.41 (триазол), 140.29 (C=C–C=O (Flu), 139.89 (C6 урацил), 132.17 (триазол), 130.95 (C=C–C=O (Flu)), 129.66 (2–CH=C (Flu)), 128.46 (–CH=C (Flu), C=CH–C–NH (Flu)), 2 C=C–O (Flu)), 123.69 (O=C–C–CH= (Flu)), 110.51 (C5 урацил), 2 HO–C–CH= (Flu)), 102.26 (2 HO–C=CH–O (Flu)), 87.60 (–C–O (Flu)), 85.21 (C4', C-1'), 70.78 (триазол– CH_2 –O– CH_2 –), 64.31 (C3'), 61.36 (C5'), 49.75 (– CH_2 – CH_2 – CH_2 -триазол), 40.05 ($(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -триазол), 36.62 (C2', $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 29.83 ($(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 26.99 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ -триазол). ИК-спектр: нет полосы N_3 2090 cm^{-1} . MALDI-TOF: $[M + H]^+$ 853.58, вычислено для $\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_{12}$ [M] 852.33.

Синтез флуоресцентных олигонуклеотидных зондов по реакции CuAAC. К раствору 40 нмоль алкинированного олигонуклеотида BCR-Z1–BCR-Z6 (табл. 1) в 30 мкл воды прибавляли 80 мкл 10 mM раствора азиды (VIб) в DMSO (800 нмоль, 20 экв), 25 мкл 1 M ТЕАА, pH 7.0 и смесь 16 мкл 50 mM раствора CuSO_4 в воде (800 нмоль, 20 экв) и 16 мкл 50 mM раствора ТВТА в DMSO (800 нмоль, 20 экв). Полученную смесь дегазировали аргоном в течение 30 с, затем прибавляли 24 мкл 0.1 M раствора аскорбиновой кислоты в воде (1600 нмоль, 40 экв). Реакционную смесь дегазировали аргоном и инкубировали при 56°C в течение 30–50 мин, после чего оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Олигонуклеотиды

осаждали насыщенным раствором LiClO_4 в ацетоне. Для удаления избытка азиды (**VIб**) осадок растворяли в воде и подвергали гель-фильтрации на Sephadex G-10. Олигонуклеотиды выделяли денатурирующим гель-электрофорезом в 12–20% полиакриламидном геле, содержащим 6–7 М мочевины.

ПЦР в режиме реального времени. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10 нг геномной ДНК человека; 400 нМ раствор каждого праймера, 200 нМ раствор зонда TaqMan; 320 мкМ растворы каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 3 мМ MgCl_2 , 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 1 ед. акт. Taq-полимеразы. ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация 3 мин при 95°C, далее 40 циклов, включающих 10 с денатурации при 95°C, 45 с гибридизации праймеров и последующей элонгации при 58°C. Заключительный шаг каждого цикла сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала. В качестве ДНК-матрицы использовали участок гена *BCR* человека, локализованного на длинном плече хромосомы 22.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 15-54-10049, 16-03-01055 и 16-04-00847). Синтез олигонуклеотидов выполнен за счет гранта РНФ № 15-15-00121. Авторы благодарят М.Ф. Касакина за помощь в регистрации масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Quantitative Real-Time PCR in Applied Microbiology. Filion M. (Ed), Norfolk, Caister Academic Press, 2012.
2. Ryazantsev D.Y., Tsybulsky D.A., Prokhorenko I.A., Kvach M.V., Martynenko Y.V., Philipchenko P.M., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zavriev S.K. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 404. P. 59–68.
3. Vasilyeva S.V., Budilkin B.I., Konevets D.A., Silnikov V.N. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2011. V. 30. P. 753–767.
4. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001. V. 40. P. 2004–2021.
5. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 3057–3064.
6. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. V. 41. P. 2596–2599.
7. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., Korshun V.A. // *Tetrahedron.* 2008. V. 64. P. 1467–1473.
8. McGeary R.P. // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 3319–3322.
9. Sinha N.D., Striepeke S. // In *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* / F. Eckstein (Ed), IRL Press at Oxford University Press: Oxford, New York, Tokyo, 1991. P. 185–210.
10. Рябинин В.А., Костина Е.В., Максакова Г.А., Сняжков А.Н. // *Биоорг. Хим.* 2016. Т. 42. С. 122–126.
11. Johansson M.K., Fidler H., Dick D., Cook R.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. P. 6950–6956.
12. Kvach M.V., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Malakhov A.D., Skorobogatyi M.V., Shmanai V.V., Korshun V.A. // *Eur. J. Org. Chemistry.* 2008. V. 12. P. 2107–2117.
13. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., Korshun V.A. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. V. 26. P. 751–754.

Fluorescent Labeling of TaqMan Oligonucleotide Probes via Cu(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) Click Chemistry

S. V. Vasilyeva*, #, E. A. Burakova*, L. G. Zhdanova**, ***, M. S. Anisimenko**, ***, and D. A. Stetsenko*

#Phone: +7 (383) 363-51-83, fax : +7 (383) 363-51-53, e-mail: svetlana2001@gmail.com

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**BioLink Ltd., ul. Timakova 2/12, Novosibirsk, 630060 Russia

***Institute of Molecular Biology and Biophysics, ul. Timakova 2/12, Novosibirsk, 630060 Russia

We describe an approach to the synthesis of TaqMan oligonucleotide probes that is based on Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) click chemistry, when oligonucleotides containing an internal alkynyl group at a pyrimidine position are labeled post-synthetically with a fluorescent azide. TaqMan probes were constructed with fluorescein in different internal positions and a BHQ1 quencher on the 3'-end. Our previously designed alkynylated deoxyuridine or deoxycytidine phosphoramidites have been employed for the synthesis of alkynyl oligonucleotides. It was demonstrated that the TaqMan probes resulted can detect accumulation of PCR product in real-time. The closer to the label the 3'-terminal quencher is the more quenching efficiency is increased but the efficiency of probe hybridization to DNA template is reduced as well.

Keywords: real-time PCR amplification, fluorescent probe, phosphoramidite