

## ВЛИЯНИЕ ЗАРЯДА ХРОМОФОРА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВКЛЮЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ МАТРИЧНОМ СИНТЕЗЕ ДНК Таq-ПОЛИМЕРАЗОЙ

© 2015 г. В.Е. Шершов, В.Е. Кузнецова, Ю.П. Лысов, Т.О. Гусейнов, В.Е. Барский,  
М.А. Спицын, О.А. Заседателева, В.А. Василисков, С.А. Суржиков,  
А.С. Заседателев, А.В. Чудинов

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

*E-mail: chud@immb.ru*

Поступила в редакцию 21.09.15 г.

С целью изучения влияния электрического заряда хромофора на эффективность включения флуоресцентно-меченных нуклеотидов в ДНК при проведении полимеразной цепной реакции были синтезированы три флуоресцентно-меченных dUTP, один из которых содержал электронейтральный, а два других – положительно и отрицательно заряженные красители, аналоги Cy5. Показано, что dUTP, меченный электронейтральным аналогом Cy5, наиболее эффективно встраивается в ДНК при проведении полимеразной цепной реакции Таq-полимеразой.

*Ключевые слова:* флуоресцентные красители, электрический заряд, эффективность ПЦР.

Во многих молекулярно-биологических и биофизических исследованиях используются фрагменты ДНК, полученные в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и содержащие флуоресцирующие маркеры. Для введения таких маркеров в цепь ДНК необходимы флуоресцирующие производные 5'-трифосфатов-2'-дезоксинуклеозидов, которые ДНК-полимераза воспринимает в качестве субстрата с тем, чтобы процесс амплификации проходил в соответствии с матрицей копирования. Эффективность включения флуоресцентно-меченных производных нуклеозидов ДНК полимеразой зависит от природы хромофора [1]. В настоящее время на рынке dUTP присутствует флуоресцентно-меченный Cy5 с отрицательным зарядом.

В данной работе исследовали влияние электрического заряда аналога Cy5 на эффективность включения Таq-полимеразой в ДНК флуоресцентно-меченных нуклеотидов в ходе ПЦР. Производные трифосфатов дезоксиуридина (dU<sup>+</sup>, dU, dU<sup>-</sup>) (рис. 1) были получены реакцией 5-аминоаллил-2'-дезоксидеоксиуридина с соответствующими красителями: с положительным зарядом dU<sup>+</sup>, электронейтральным dU и отрицательным зарядом dU<sup>-</sup> [2,3].

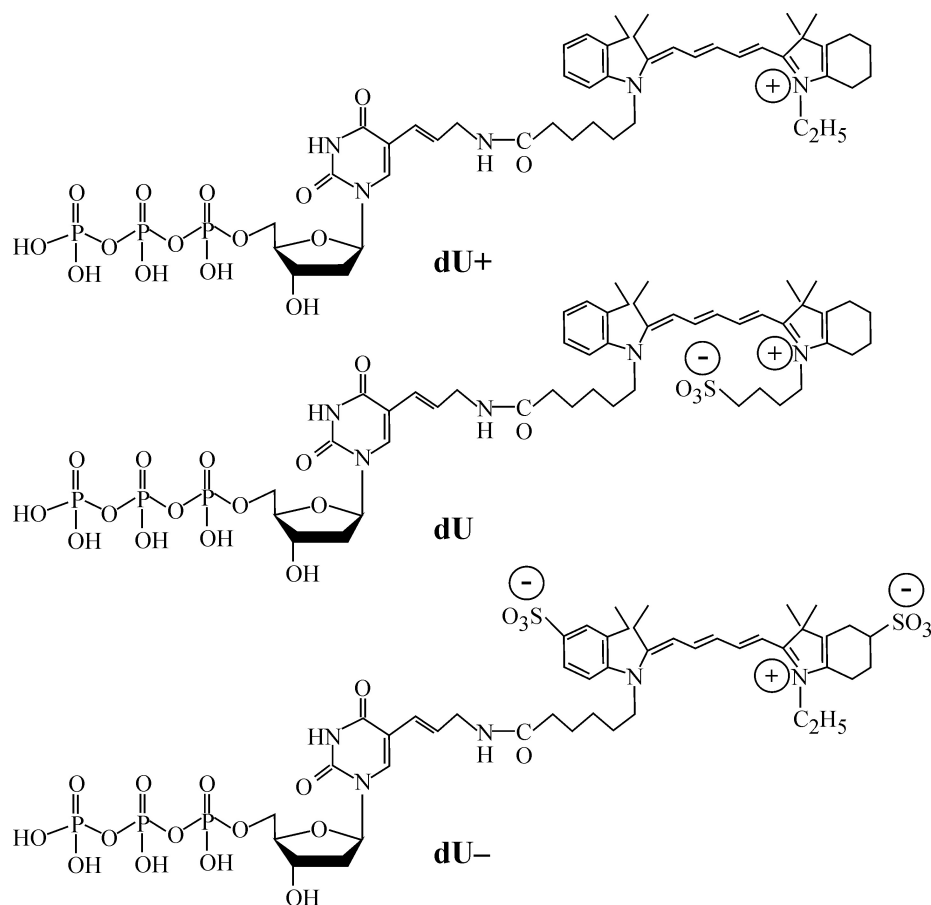
В работе использовали следующие олигонуклеотиды: 5'-TCT CTT GCC GTT TCG TCT

СТА ААТ TGT CTT ААТ GTC TTG TAT CCT TCT CTC TCA CCA CTT ACA TCC CC-3' (матрица); Cy3-NH-5'-GGG GAT GTA AGT GGT GAG-3' (праймер P1); Cy3-NH-5'-TCT CTT GCC GTT TCG TC-3' (праймер P2). Праймеры P1 и P2 были мечены по 5'-концу аналогом красителя Cy3 с максимумами в спектрах поглощения и флуоресценции 550 и 565 нм [2].

При проведении ПЦР в реакционную смесь объемом 25 мкл добавляли 2,5·10<sup>-6</sup> М каждого праймера; 10<sup>-8</sup> М матрицы; 5·10<sup>-4</sup> М каждого из dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 15 ед. (3 мкл) Таq-полимеразы (Sileks, Москва), буфер (70 мМ трис-НСl, 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, рН 8,6), 3 мМ MgCl<sub>2</sub> и один из флуоресцентно-меченных dUTP.

На рис. 2 представлены результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР. На рис. 2а (дорожка 3) видно, что добавление 5% dU<sup>+</sup> приводит к уменьшению количества полноразмерного продукта ПЦР по сравнению с ПЦР в присутствии природных dNTP (дорожка 2). Полное ингибирование ПЦР положительно заряженным dU<sup>+</sup> происходит при 20% содержании этого дезоксиуридина в смеси (дорожка 5). Добавление 5% dU не влияет на количество полноразмерного продукта (дорожка 7). Увеличение количества dU в реакционной смеси приводит к уменьшению продукта ПЦР. Полное ингибирование ПЦР нейтральным по заряду dU происходит при 50% содержании dU

Сокращение: ПЦР – полимеразная цепная реакция.



**Рис. 1.** Строение флуоресцентно-меченных трифосфатов с положительным зарядом красителя **dU+**, с электро-нейтральным красителем **dU** и с отрицательным зарядом красителя **dU-**. Максимумы спектров поглощения и флуоресценции, а также молярных коэффициентов экстинкции и квантовых выходов флуоресценции составляют: для **dU+** – 639 нм, 655 нм, 1,1, 0,15; для **dU** – 639 нм, 655 нм, 1,9, 0,16; для **dU-** – 649 нм, 662 нм, 2,5, 0,27 соответственно.

в смеси. Таким образом, нейтрально заряженный **dU** в меньшей степени ингибирует ПЦР, чем положительно заряженный **dU+**.

Отрицательно заряженный **dU-** почти не влияет на количество продуктов амплификации (дорожки 11–14) (рис. 2а). Отношение интенсивностей суммарного сигнала флуоресценции в диапазоне  $S_{\text{У3}}$  для полноразмерных продуктов ПЦР в дорожках 2, 3, 7 и 11 составляет 1,0 : 0,5 : 1,0 : 1,0 соответственно.

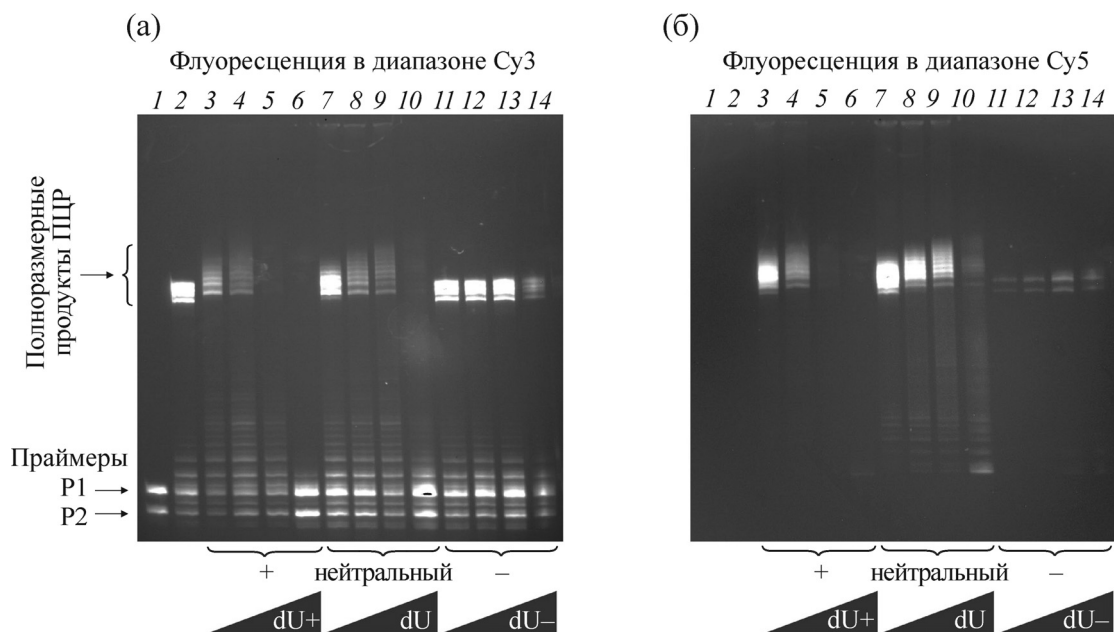
Рис. 2б демонстрирует, что положительно заряженный **dU+** и нейтральный по заряду **dU** встраиваются в полноразмерные продукты ПЦР (дорожки 3–4, 7–9). Встраивание отрицательно заряженного **dU-** почти не происходит (яркость флуоресценции для полноразмерных продуктов дорожек 11–14 близка к нулю). Отношение интенсивностей суммарного сигнала флуоресценции в диапазоне  $S_{\text{У5}}$  для продуктов ПЦР в дорожках 3, 7 и 11 составляет 0,5 : 1,0 : 0,05

соответственно. Таким образом, в ходе ПЦР Таq-полимераза эффективнее встраивает дезоксиуридин, модифицированный электронейтральным аналогом  $S_{\text{У5}}$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении ПЦР с помощью Таq-полимеразы включение дезоксиуридина, меченного аналогом  $S_{\text{У5}}$ , происходит удовлетворительно при нейтральном заряде хромофора, в два раза хуже при положительном заряде хромофора и в 20 раз хуже при отрицательном заряде хромофора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-14-01090.



**Рис. 2.** Встраивание модифицированных дезоксиуридинов ( $dU^+$ ,  $dU$ ,  $dU^-$ ) Таq-полимеразой в ходе ПЦР по матрице в присутствии праймеров P1 и P2. Представлены результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР в денатурирующем 20% полиакриламидном геле в свете флуоресценции Cy3 (а) и аналогов Cy5 (б). Дорожка 1 – праймеры P1 и P2, дорожка 2 – продукты ПЦР при наличии только природных нуклеозидтрифосфатов. Дорожки 3–14 – продукты ПЦР в присутствии природных нуклеозидтрифосфатов и увеличивающихся по отношению к dT количеств модифицированных дезоксиуридинтрифосфатов (5, 10, 20 и 50%). Дорожки 3–6 – с добавлением  $dU^+$ ; дорожки 7–10 – с добавлением  $dU$ ; дорожки 11–14 – с добавлением  $dU^-$ . Возрастание количеств  $dU^+$ ,  $dU$  и  $dU^-$  для дорожек 3–14 схематично показано под изображениями геля.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Giller, T. Tassara, B. Angerer, et al., Nucl. Acids Res. **31** (10), 2630 (2003).
2. R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, et al., Bioconjug. Chem. **4** (2), 105 (1993).
3. H. Yu, J. Chao, D. Patek, et al., Nucl. Acids Res. **22** (15), 3226 (1994).

## The Effect of the Chromophore Charge on the Efficiency of Incorporation of Fluorescently-labeled Nucleotides in Matrix Synthesis by Taq DNA Polymerase

V.E. Shershov, V.E. Kuznetsova, Yu.P. Lysov, T.O. Guseinov, V.E. Barsky,  
M.A. Spitsyn, O.A. Zasedateleva, V.A. Vasiliskov, S.A. Surzhikov,  
A.S. Zasedatelev, and A.V. Chudinov

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

In order to study the effect of an electrical charge of the chromophore, on the efficiency of incorporation of fluorescently-labeled nucleotides into DNA during PCR, three fluorescently-labeled dUPT, one of which with electroneutral and other two with positively and negatively charged dyes (Cy5 analogs), were synthesized. It is shown that dUPT, labeled with electroneutral Cy 5 analog, is most effectively incorporated into DNA when Taq polymerase is used for PCR.

*Key words:* fluorescent dyes, electrical charge, PCR efficiency