БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 1, с. 31–39

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.29:615

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА ПРИ МАРКИРОВАНИИ ДНК ЦИАНИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ КРАСНОГО И БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА

© 2021 г. А.Ю. Иконникова, В.Е. Шершов, Ю.В. Мороз, В.А. Василисков, С.А. Лапа, Р.А. Мифтахов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина

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

E-mail: nased@biochip.ru

Поступила в редакцию 22.09.2020 г.
После доработки 22.09.2020 г.
Принята к публикации 26.09.2020 г.

Исследована чувствительность гибридизационного анализа с использованием биологического микрочипа при маркировании ДНК производными 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, содержащими цианиновые красители типа Cy5 и Cy7 в качестве флуорофора. Были выбраны два Cy5-dUTP и два Cy7-dUTP, способные эффективно встраиваться в растущую цепь ДНК в ходе ПЦР. Продукты ПЦР, флуоресцентно-меченные разными красителями, гибридизовали с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биологического микрочипа. Результаты гибридизации регистрировали с помощью цифровой люминесцентной микроскопии в красном (для Cy5-dUTP) и ближнем инфракрасном (для Cy7-dUTP) диапазонах. Методом последовательных разведений определена минимальная исходная концентрация ДНК, при которой возможно определение генотипа в результате специфического взаимодействия флуоресцентно-меченного ПЦР-продукта и олигонуклеотидных зондов на биочипе. Показано, что флуоресцентно-меченные Cy7-dUTP обеспечивают более высокую чувствительность гибридизационного анализа по сравнению с Cy5-dUTP.

Ключевые слова: флуоресценция, модифицированные нуклеотиды, цианиновые красители, ИК-диапазон, ближний ИК-диапазон, биологические микрочипы, аллель-специфичная гибридизация.

DOI: 10.31857/S000630292101004X

Флуоресцентное маркирование нуклеиновых кислот с целью визуализации результатов молекулярно-генетического анализа является широко распространеным подходом в диагностических исследованиях [1]. Цианиновый краситель Cy5, поглощающий и флуоресцирующий в красной области спектра (600–700 нм), используется во многих исследовательских и коммерческих тестах, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени или гибридизационном анализе с использованием биологических микрочипов (microarray) [2, 3].

Основными характеристиками любого диагностического метода являются его аналитическая чувствительность и точность. Естественным препятствием для повышения анналитической чувствительности анализа является остаточная фоновая флуоресценция биологического материала. Переход в ближнюю инфракрасную область в диапазоне 700–900 нм с меньшей фоновой флуоресценцией, в так называемое «диагностическое окно биологической ткани», позволяет решить эту проблему [4, 5].

К флуоресцентным меткам, спектрально попадающим в «диагностическое окно биологической ткани», относятся гептаметиновые цианиновые флуоресцентные красители Cy7 с максимумами поглощения и флуоресценции в диапазоне 700–900 нм. Биологические ткани и их компоненты в этой спектральной области имеют минимальное поглощение и минимальную собственную флуоресценцию [6, 7], поэтому, например, оказалось возможным использовать гептаметиновые красители Cy7, связанные с рецепторными группами, в инфракрасной визуализации опухолевых тканей [8, 9].

Интерес к флуоресцентным красителям ближнего инфракрасного диапазона возрос после того, как было показано, что использование гептаметиновых цианиновых флуоресцентных красите-

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, Cy5-dUTP – флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU2 и dU49, Cy7-dUTP – флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU83 и dU84.

лей в твердофазном иммунологическом анализе в качестве флуоресцентной метки позволяет добиться чрезвычайно высокой чувствительности, соизмеримой с чувствительностью иммуноферментного анализа, использующего в качестве метки пероксидазу хрена [10]. С флуоресцентными метками видимого оптического диапазона добиться такой чувствительности не представляется возможным.

Гептаметиновые цианиновые красители достаточно стабильны в условиях проведения молекулярно-биологического анализа и обладают высокими коэффициентами молярной экстинкции и высокими квантовыми выходами флуоресценции [11–13].

Ранее было показано, что флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU2 и dU49 (Cy5-dUTP) встраиваются в растущую цепь ДНК в ходе ПЦР, причем эффективность встраивания зависит от структуры флуорофора, а также химического строения линкера, соединяющего нуклеотид с флуорофором [14–16]. Также было показано, что флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU83 и dU84 (Cy7-dUTP) способны встраиваться в ПЦР-продукты и обеспечивать высокую эффективность гибридизационного анализа [17]. Однако прямое сравнение наиболее перспективных производных Cy5-dUTP и Cy7-dUTP по их способности влиять на чувствительность и специфичность аллель-специфичной гибридизации на биологических микрочипах ранее не проводилось.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ эффективности гибридизационного анализа при маркировании ДНК, синтезируемой de novo в ходе ПЦР, с помощью 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, содержащих пентаметиновый аналог Cy5, флуоресцирующий в красной области, или гептаметиновый аналог Cy7, флуоресцирующий в ближней инфракрасной области. Показано, что Cy7-dUTP позволяют достичь более высокой разрешающей способности гибридизационного анализа по сравнению с Cy5-dUTP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. В качестве мишени для амплификации выступали локусы, которые вносят вклад в полигенный риск развития рака молочной железы: rs4808801 в гене SSBP4, rs4849887 в локусе 2q14.2, rs4973768 в гене SLC4A7. Использовали следующие пары праймеров:

1) rs4808801_F GTCCTGCTGACCCCCACAG и rs4808801_R tcattggatctcattaGTGCCACTGTGACTTCCCCT;

2) rs4849887_F TCGAGTGTCTGGCTTCCAGC и rs4849887_R tcattggatctcattaCAGGGGTCCAGGTGGTTGAG;

3) rs4973768_F CTGTCACTGTCTCTCAATGAATGCT и rs4973768_R tcattggatctcattaCTGACTACTCCATTTAAGAGCAAAGGT.

Последовательность обратного праймера включала локус-специфичную часть и адаптер (выделен прописными буквами), что позволяло асимметрично нарабатывать ПЦР-продукт в ходе одноэтапной ПЦР для последующей гибридизации на биочипе.

Оценивали влияние Cy5-dUTP и Cy7-dUTP на прохождение ПЦР в зависимости от их концентрации с помощью ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen. Амплификацию проводили с праймерами для анализа rs4849887 в локусе 2q14. Использовали коммерчески доступную полимеразу с горячим стартом SynTaq ДНК-полимераза (НПК «Синтол», Россия). Состав реакционной смеси: 5 нг ДНК, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) в концентрации 200 мкМ каждый, 1×ПЦР буфер SynTaq, 1.5 мМ MgCl2, праймеры в концентрации 300 нМ, 1×EvaGreen (Biotium, США) и 0.75 ед. активности полимеразы на реакцию (объем реакционной массы 25 мкл). Также в реакцию добавляли один из двух Cy7-dUTP (dU83, dU84) или Cy5-dUTP (dU2, dU49) в концентрации 20, 8 и 4 мкМ. Реакцию проводили на приборе Light-Cycler 96 (Roche, Швейцария) по следующей программе: 94°C – 4 мин, 45 циклов (94°C – 15 с, 62°C – 30 с, 72°C – 30 с) с детекцией флуоресценции красителя EvaGreen по каналу ResoLight.

Для оценки показателя динамики ПЦР в реальном времени использовали скорость амплификации, рассчитанную по тангенсу угла наклона линейного участка кривой накопления флуоресцентного сигнала (tgα) [5], которую нормировали на скорость ПЦР без добавления модифицированных нуклеотидов.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле и проводили детекцию по каналу SYBR Green I с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad, США) и по каналам Cy5 и Cy7 с использованием исследовательского анализатора гелей. Возбуждение флуоресценции осуществлялось с помощью ртутной лампы, регистрация – с помощью встроенного прибора с зарядовой связью RTE/CCD-1536-K/1 (Roper Scientific, США), поле регистрации 15 × 15 см. Флуоресценцентные сигналы регистрировали с диапазоном пропускания 630–

690 нм для Cy5 и 810–830 нм для Cy7 соответственно.

Электрофореграммы анализировали с помощью программы ImageJ. Эффективность встраивания (*Eff*) исследуемых Cy5- dUTP и Cy7-dUTP определяли как долю флуоресцентно-меченного продукта в общем количестве наработанного продукта, т. е. как отношение суммарной интенсивности сигналов по каналам Cy5 и Cy7 ($I_{Cy} = S \cdot I_{средн}$, где S – площадь, занимаемая флуоресцентно-меченным продуктом, $I_{средн}$ – среднее локальное значение флуоресценции ПЦР-продукта) к интенсивности сигналов по каналу SYBR Green I ($I_{SG} = S \cdot I_{сред}$), с учетом квантового выхода (QCy7) и коэффициента молярной экстинкции (ε_{Cy7}).

$$Eff = \frac{I_{Cy7}}{I_{SG}\, Q_{Cy7}\, \varepsilon_{Cy7}}.$$

Для проведения аллель-специфичной гибридизации с флуоресцентно-меченным ПЦР-продуктом использовали иммобилизованные олигонуклеотиды, позволяющие определять различные аллели для rs4808801, rs4849887, rs4973768:

N1 (rs4808801)_A CAAGAAGCAGACGAGCT

N1 (rs4808801)_G CAAGAAGCGGACGAGC

N2 (rs4849887)_C TGGCAATGCTGAAGCT-TG

N2 (rs4849887)_T CTGGCAATGTTGAAGCT-TG

N3 (rs4973768)_C GCAGTTAATTACCTAAAC-ATGAG

N3 (rs4973768)_T GCAGTTAATTACTTAAAC-ATGAGT

В состав реакции входили 1×ПЦР буфер, 4 мМ $MgCl_2$, 0.2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 2.5 ед. полимеразы SynTaq, по 1 пмолю локус-специфичных праймеров, 100 пмолей универсального праймера 5'-TCATTGGATCTCAT-TA-3', ДНК в количестве 10, 5, 0.5 или 0.05 нг, а также исследуемые Cy5-dUTP или Cy7-dUTP в концентрациях 20, 8 и 4 мкМ (объем реакционной массы 25 мкл). Гибридизацию на биочипе осуществляли в смеси, содержащей 25% формамида, 5×SSPE, 50 об.% ПЦР-продукта, в течение 6–8 ч при 37°C, после инкубации промывали и высушивали. Флуоресцентные сигналы регистрировали методом цифровой люминесцентной микроскопии с помощью двух разных анализаторов биочипов: 1) при возбуждении на 655 нм и регистрации флуоресцентных сигналов в диапазоне 716 ± 22 нм для Cy5; 2) при возбуждении на 760 ± 25 нм и регистрации на 810–830 нм для Cy7 [18, 19]. Анализ изображения проводили с помощью программы ImaGeWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия). Интенсивность флуоресценции в ячейке биочипа $I(f)$ определяли по формуле $(I_{in} - I_{out})/I_{out}$, где I_{in} – интегральное значение флуоресценции внутри ячейки, I_{out} – интегральное значение флуоресценции фона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы исследовали четыре производных 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, связанных по 5-положению с цвитерионными индодикарбоцианиновыми красителями (два Cy5-dUTP) и индотрикарбоцианиновыми красителями (два Cy7-dUTP). Химическое строение и оптические характеристики флуоресцентно-меченных дезоксиуридинтрифосфатов приведены на рис. 1. Все соединения имели суммарный нейтральный заряд, что обеспечивает высокую эффективность встраивания флуоресцентно-меченных нуклеотидов в ПЦР продукты [12, 15, 17].

Влияние Cy5-dUTP и Cy7-dUTP на скорость амплификации изучали методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen [17]. Каждый из исследуемых дезоксиуридинтрифосфатов добавляли в трех концентрациях: 20, 8 и 4 мкМ. Результаты представлены на рис. 2. Видно, что в присутствии производного Cy7-dU83 скорость реакции практически не изменяется при всех трех концентрациях, в случае остальных соединений выраженный эффект ингибирования ПЦР наблюдался при концентрации 20 мкМ. Наименьшее влияние на скорость реакции отмечается для всех соединений при концентрации 4 мкМ, как было описано ранее [15, 17].

Способность изучаемых модифицированных d-UTP встраиваться в ДНК в ходе ПЦР оценивали на основании количественного анализа электрофореграмм, полученных для продуктов ПЦР в реальном времени, по каналам SYBR, Cy5 и Cy7 (рис. 3). Эффективность встраивания определяли по отношению количества флуоресцентно-меченного продукта, определенном на каналах Cy5 и Cy7, к общему количеству наработанного в реакции полноразмерного продукта, определеного на канале SYBR, с учетом квантового выхода Q и коэффициента молярной экстинкции ε соответствующего красителя (рис. 1).

Результаты анализа электрофореграмм представлены на рис. 4. Эффективность встраивания флуоресцентно-меченных нуклеотидов в растущую цепь ДНК заметно снижается с уменьшением концентрации 20 мкМ > 8 мкМ > 4 мкМ для всех использованных соединений. Наименьшая эффективность встраивания наблюдается для dU83 по сравнению с другими флуоресцентно-меченными трифосфатами в тех же концентрациях. В то же время при концентрации 4 мкМ все исследованные соединения имели близкую эффективность встраивания. С учетом того, что все исследованные трифосфаты при концентрации

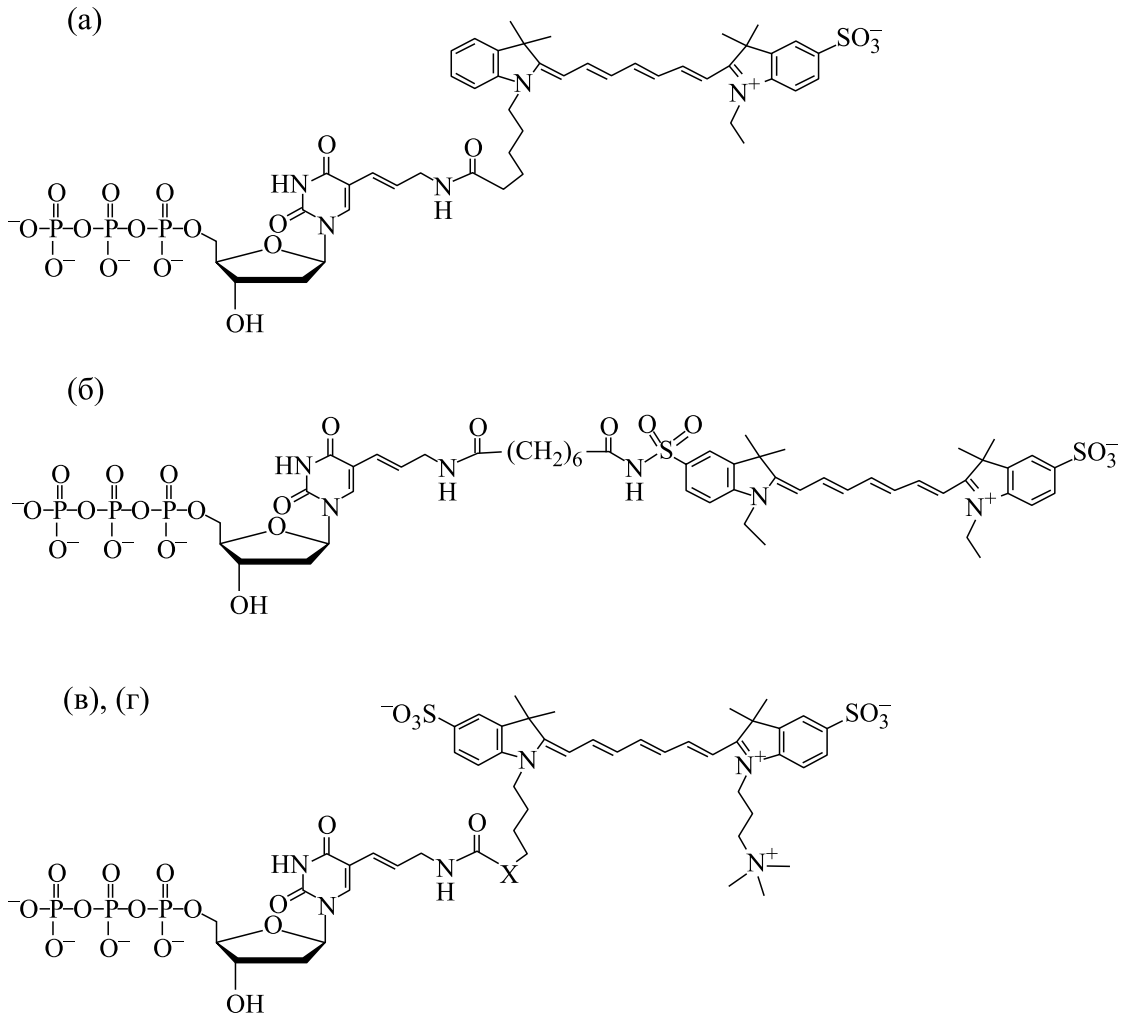

Рис. 1. Химическое строение и оптические характеристики аналогов Cy5 и Cy7, измеренные в фосфатно-солевом буфере (0.15 M NaCl, 10 мМ калий-фосфат, pH 7.4). (а) – dU2: $\varepsilon = 2.10 \cdot 10^5$ M^{-1} $см^{-1}$, $\lambda_{max}^{abs} =$ 643 нм, $\lambda_{max}^{em} =$ 661 нм, квантовый выход Q = 12%; (б) – dU49: $\varepsilon = 2.12 \cdot 10^5$ M^{-1} $см^{-1}$, $\lambda_{max}^{abs} =$ 647 нм, $\lambda_{max}^{em} =$ 664 нм, квантовый выход $Q = 36\%$; (в) – dU83: X = $-CH_2-$, $\varepsilon = 1.95 \cdot 10^5$ M^{-1} $см^{-1}$; $\lambda_{max}^{abs} =$ 744 нм, λemmax = 767 нм, квантовый выход $Q = 27\%$; (г) – dU84: X = $-(CH_2)_5NHCOCH_2-$, $\varepsilon = 1.99 \cdot 10^5$ M^{-1} $см^{-1}$; $\lambda_{max}^{abs} =$ 744 нм, $\lambda_{max}^{em} =$ 767 нм, квантовый выход $Q = 29\%$.

4 мкМ практически не ингибируют ПЦР, именно эта концентрация была выбрана в качестве рабочей в дальнейших экспериментах.

Для сравнительной оценки аналитической чувствительности метода при использовании различных флуоресцентно-меченных трифосфатов проводили ПЦР с последовательными разведениями ДНК-мишени таким образом, что в реакции ПЦР использовали 5, 0.5 и 0.05 нг ДНК. Далее флуоресцентно-меченные продукты ПЦР гибридизовали с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биочипа. На рис. 5 представлены результаты гибридизационного анализа при количестве исходной ДНК мишени 5 нг в одной реакции ПЦР. Гибридизационный анализ проводили в двух форматах: 1) три моноплексные ПЦР с последующей мультиплексной гибридизацией и 2) мультиплексная ПЦР с тремя парами праймеров и мультиплексная гибридизация. Как видно, dU84 демонстрирует наиболее четкое распределение и наибольшую интенсивность флуоресцентных сигналов как в моноплексном, так и в мультиплексном формате ПЦР. В целом интенсивность флуоресцентных сигналов на биочипе заметно выше для Cy7-dUTP по сравнению с Cy5-dUTP. Среди производных Cy5-dUTP наиболее четкую картину наблюдали для dU49 по сравнению с dU2, это различие более заметно при проведении ПЦР в мультиплексном формате (рис. 5в).

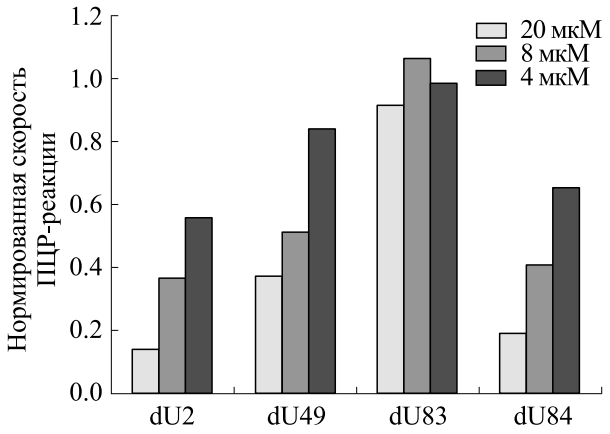

Рис. 2. Ингибирование полимеразной цепной реакции в зависимости от концентрации Cy5- и Cy7-dUTP. По оси ординат – скорость реакции в присутствии Cy-dUTP, нормированная на скорость реакции без добавления модифицированного нуклеотида, по оси абсцисс – различные соединения-аналоги Cy5 и Cy7 в концентрации 20, 8 и 4 мкМ соответственно.

Чувствительность и специфичность гибридизации также зависит от последовательности самого олигонуклеотидного зонда и вторичной структуры участвующего в гибридизации ПЦР-продукта. Это приводит к тому, что при уменьшении количества ДНК-мишени наблюдается «выпадание» сигналов, в первую очередь от тех зондов, которые по ряду причин образуют совершенные дуплексы с меньшей температурой плавления. Дальнейшие измерения интенсивности флуоресцентных сигналов для dU2, dU49, dU83 и dU84 при различных количествах ДНК-мишени проводили для наиболее сильно гибридизующегося зонда N3 (рис. 6). В целом интенсивность флуоресцентных сигналов для Cy7-dUTP существенно выше по сравнению с Cy5-dUTP. При количестве исходной ДНК, равном 5 нг, различие между dU84 и dU2, dU49 составляет около одного порядка. Интенсивность сигнала при минимальном количестве ДНК (0.05 нг) для dU84 достаточно высока и составляет около 40% от уровня сигнала при 5 нг ДНК, в то время как для dU2 и dU49 флуоресцентные сигналы едва превышают фон.

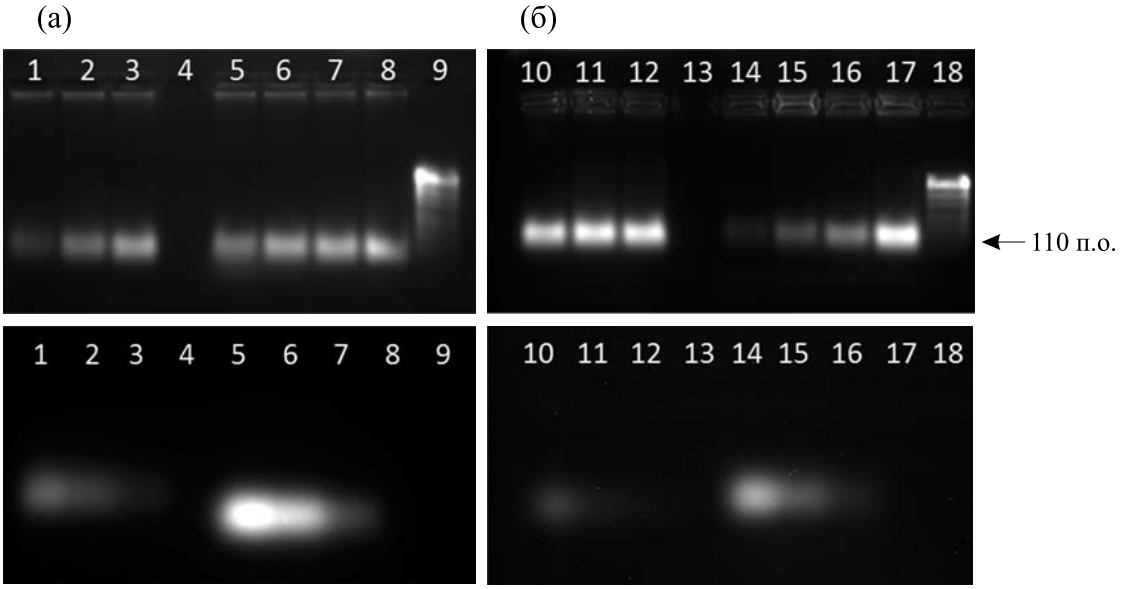

Рис. 3. Электрофореграммы ПЦР-продуктов, полученных в реакции с Cy5-dUTP (а) и Cy7-dUTP (б). Вверху – детекция по каналу SYBR Green, внизу – по каналу Cy5 (а) и Cy7 (б). Дорожки 1, 2, 3 – dU2, 5, 6, 7 – dU49, 10, 11, 12 – dU83, 14, 15, 16 – dU84 в концентрациях 20, 8 и 4 мкМ каждый соответственно; 4 и 13 – пустой гель; 8 и 17 – продукт ПЦР без модифицированного нуклеотида; 9 и 18 – маркер длины фрагментов PUC19.

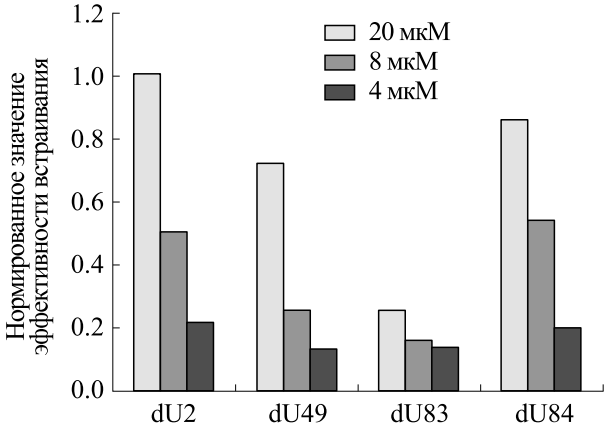

Рис. 4. Результаты количественного определения эффективности встраивания модифицированных нуклеотидов Cy5-dUTP и Cy7-dUTP. По оси ординат – нормированное значение эффективности встраивания (эффективность встраивания в процентном отношении к максимальному значению для dU2), по оси абсцисс– различные соединения-аналоги Cy5 и Cy7 в концентрации 20, 8 и 4 мкМ соответственно.

Более длительное время экспозиции биочипа при регистрации флуоресцентного сигнала приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, однако эта зависимость проявляется по разному для Cy5- и Cy7-dUTP (рис. 7а). Для dU84 (Cy7-dUTP) наблюдали быстрый рост флуоресцентных сигналов при выдержках от 50 до 400 мс, при дальнейших измерениях интенсивность флуоресценции достигала максимума и выходила за пределы динамического диапазона регистрирующего устройства, в то же время фоновая флуоресценция продолжала расти. Для dU49 (Cy5-dUTP) общая интенсивность флуоресценции была существенно ниже, регистрация при всех выдержках от 50 до 800 мс происходила в пределах динамического диапазона, поэтому мы наблюдали постоянный рост интенсивности флуоресцентных сигналов от ячеек с совершенными дуплексами при очень низкой фоновой флуоресценции. Эта картина наглядно воспроизводится при определении отношения сигнала от совершенных дуплексов к фоновой флуоресценции пустого геля (рис. 7б). При выдержках от 50 до 300 мс это отношение заметно выше для dU84, при времени экс-

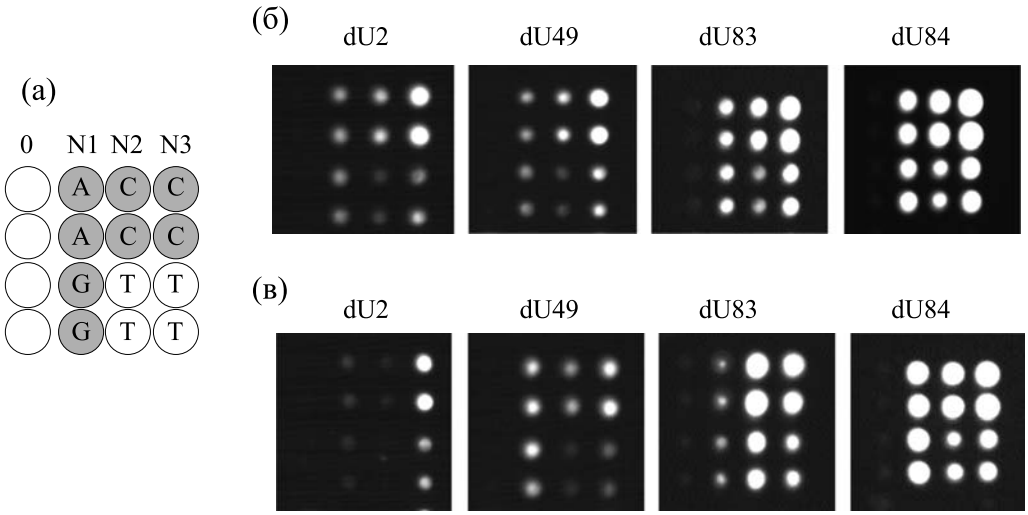

Рис. 5. Результаты гибридизационного анализа при количестве исходной ДНК-мишени 5 нг в реакции ПЦР. (а) – Схема расположения олигонуклеотидных зондов на биочипе: 0 – пустой гель, N1 – rs4808801 (аллели A и G), N2 – rs4849887 (аллели C и T), N3 – rs4973768 (аллели C и T); серым цветом отмечены ячейки, соответствующие генотипу данного образца AG/CC/CC. (б) и (в) – Картины гибридизации после ПЦР с добавлением различных Cy-dUTP (выдержка 300 мс): (б) – моноплексный формат ПЦР (три параллельные реакции с гибридизацией на одном биочипе); (в) – мультиплексный формат ПЦР (одна реакция с тремя парами праймеров в одной пробирке).

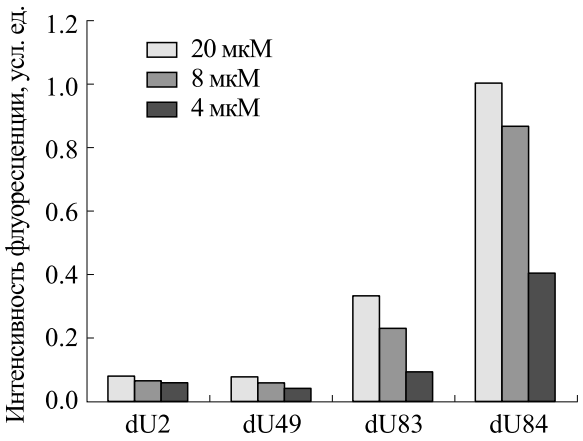

Рис. 6. Результаты гибридизационного анализа. По оси ординат – интенсивность флуоресцентного сигнала от совершенных дуплексов для олигонуклеотидного зонда N3; по оси абсцисс – различные соединения-аналоги Cy5 и Cy7 при количестве исходной ДНК-мишени 5, 0.5 и 0.05 нг соответственно (выдержка 300 мс).

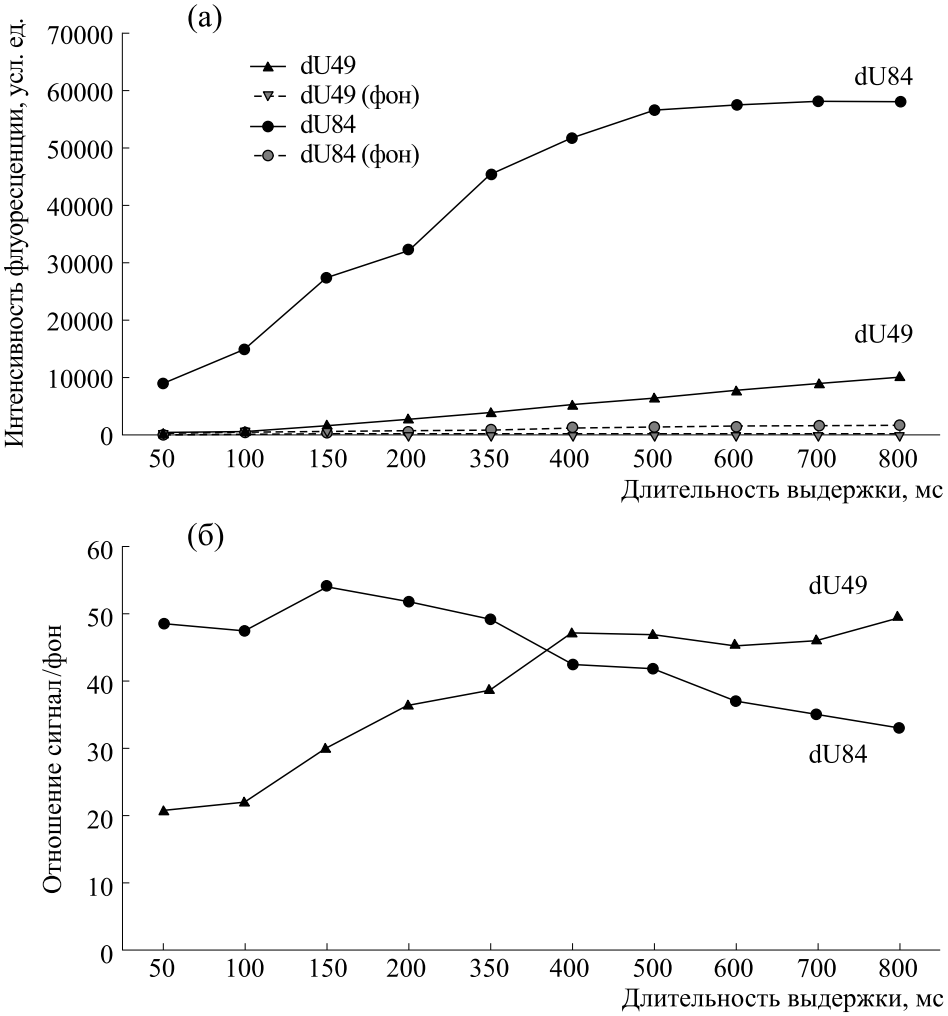

Рис. 7. Интенсивность флуоресценции для Cy5-dU49 и Cy7-dU84 в зависимости от длительности выдержки при регистрации картины гибридизации. По оси ординат: (а) – абсолютные значения интенсивности сигналов от совершенных дуплексов и ячейки с пустым гелем (фоновая флуоресценция геля), (б) – отношение сигнал/фон; по оси абсцисс – выдержка при регистрации сигналов в мс.

позиции более 400 мс это преимущество утрачивается в связи с ограничениями самой системы регистрации флуоресценции.

Известно, что применение красителей, флуоресцирующих при возбуждении в красной области спектра, позволяет повысить чувствительность анализов за счет уменьшения интенсивности флуоресценции компонентов исследуемого объекта, подложки, реагентов для проведения анализа [6, 7]. В настоящее время в качестве флуоресцентных меток в молекулярно-биологических исследованиях, включая исследования, проводимые с помощью биочипов, широко используют красители, флуоресцирующие в красной области спектра [20, 21]. Переход к красителям ближнего инфракрасного диапазона позволяет повысить надежность регистрации целевого флуоресцентного сигнала на фоне флуоресцирующих примесей [10].

Ранее при анализе флуоресценции ячеек, содержащих растворы красителей Cy5 и Cy7 с различной концентрацией, было показано, что при одной и той же концентрации краситель Cy7 давал более высокую интенсивность флуоресцентного сигнала по сравнению с красителем Cy5 [18]. Гибридизационный анализ продуктов ПЦР является многоэтапным процессом. Помимо спектральных характеристик самих красителей на интенсивность флуоресцентных сигналов оказывают влияние эффективность встраивания модифицированных нуклеотидов в анализируемую ДНК, количество наработанного продукта при проведении ПЦР, константа связывания ПЦР-продукта с комплементарным зондом и способность неспецифически связываться с некомплементарными зондами и элементами биочипа, а также характеристики самого регистрирующего устройства [19].

По результатам комплексного исследования показано, что Cy7-dUTP обладают рядом преимуществ по сравнению с Cy5-dUTP в качестве флуоресцентной метки при маркировании ДНК для гибридизационного анализа. Более высокая интенсивность регистрируемых сигналов, высокая эффективность встраивания в ходе ПЦР, меньшее влияние на специфичность взаимодействия праймеров с ДНК-мишенью обеспечивают более высокую аналитическую чувствительность метода, что дает возможность использовать более высокий уровень мультиплексности ПЦР при использовании флуоресцентно-меченных Cy7-dUTP по сравнению с Cy5-dUTP.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 05.604.21.0234, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0234).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. T. Ranasinghe and T. Brown, Chem. Commun. **44**, 5487 (2005).
2. M. Dullaert-de Boer, O. W. Akkerman, M. Vermeer, et al., PLoS One **13** (1), e0190847 (2018).
3. J. L. Ballard, V. K. Peeva, C. J. deSilva, et al., Mol. Biotechnol. **36** (3), 175 (2007).
4. E. Terpetsching and O. S. Wolfberg, in *Near-Infrared Dyes for High Technology Applicatios*. NATO ASI Series. Series 3. High Technology (Kluwer Acad. Publ., 1998), vol. 52, p. 161.
5. E. Soini and I. Hemmila. Clin. Chem. **25** (3), 353 (1979).
6. S. Daehne, U. Resch-Genger, and O. S. Wolfberg, in *Near-Infrared Dyes for High Technology Applicatios*. NATO ASI Series. Series 3. High Technology (Kluwer Acad. Publ., 1998), vol. 52, p. 458.
7. G. Patonay and M. D. Antoine, Anal. Chem. **63** (6), 321a (1991).
8. W. M. Leevy, S. T. Gammon, and J. R. Johnson. Bioconj. Chem. **19**, 686 (2008).
9. B. A. Smith, W. J. Akers, and W. M. Leevy, Am. Chem. Soc. **132** (1), 67 (2010).
10. A. E. Boyer, M. Lipowska, J.-M. Zen, and G. Patonay. Anal. Lett. **25** (3), 415 (1992).
11. M. A. Spitsyn, V. E. Kuznetsova, V. E. Shershov, et al., Dyes and Pigments **147**, 199 (2017).
12. O. A. Zasedateleva, V. A. Vasiliskov, S. A. Surzhikov, et al., Nucl. Acids Res. **46**, e732018 (2018).
13. Д. О. Фесенко, Т.О. Гусейнов, С.А. Лапа и др., Молекуляр. биология **52** (3), 533 (2018).
14. В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, Ю. П. Лысов и др., Биофизика **60** (6), 1216 (2015).
15. Т. С. Лисица, В. Е. Шершов, М. А. Спицын и др., Биофизика **62** (3), 464 (2017).
16. М. А. Спицын, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов и др., Биоорган. химия **43** (4), 444 (2017).
17. В. Е. Шершов, А. Ю. Иконникова, В. А. Василисков, С. А. Лапа и др., Биофизика **65** (5), 865 (2020).
18. М. А. Спицын, В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова и др., Молекуляр. биология **49** (5), 760 (2015).
19. Y. Lysov, V. Barsky, D. Urasov, et al., Biomed. Opt. Express **8** (11), 4798 (2017).

20. W. Li, F. Jiangli, Q. Xiaoqiang, et al., Photobiol. A: Chemistry **210**, 168 (2010).
21. W. Lee, P. H. von Hippel, and A. H. Marcus, Nucl. Acids Res. **42**, 5967 (2014).

Evaluation of the Effectiveness of Hybridization Analysis when DNA is Labeled with Red and Near-Infrared Cyanine Dyes

A.Yu. Ikonnikova, V.E. Shershov, Yu.V. Moroz, V.A. Vasiliskov, S.A. Lapa, R.A. Miftakhov, V.E. Kuznetsova, A.V. Chudinov, and T.V. Nasedkina

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

We present a study of the sensitivity of hybridization analysis using a biological microchip when DNA is labeled with 2'-deoxyuridine¬-5'-triphosphates derivatives containing cyanine dyes Cy5 and Cy7 used as fluorophores. Two Cy5-dUTP and two Cy-7-dUTP dye analogs that can be effectively incorporated into a newly synthesized DNA strand during PCR were chosen for this study. The PCR products fluorescently labeled with different dyes were hybridized with a matrix of oligonucleotide probes immobilized within the microchip hydrogel cells. Fluorescent signals were recorded on a digital fluorescence microscope in the red (for Cy5-dUTP) and near-infrared (for Cy-7-dUTP) range. The minimum DNA concentration needed for genotypic studies at the end point of the relationship between the fluorescent-labeled PCR product and oligonucleotide probes on the biochip was determined using the serial dilution method. It was shown that the fluorescent labeled Cy7-dUTP unlike Cy5-dUTP provides greater sensitivity of hybridization analysis.

Keywords: fluorescence, modified nucleotides, cyanine dyes, red range, near-infrared range, biological microarray, allele-specific hybridization