

УДК 577.213.32+577.213.39+577.213.44

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-5-408-417>

EDN KLGQRR



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Исследование субстратных свойств флуоресцентно-меченых пиримидинтрифосфатов в рекомбиназной полимеразной амплификации

А.С. Епифанов✉, В.Е. Шершов, С.А. Суржиков, А.В. Чудинов, С.А. Лапа

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук, Москва, 119991 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: alex.E.797@yandex.ru

Аннотация

Цели. Изучить субстратные свойства трифосфатов дезоксинуклеозидов различной природы (dU и dC), флуоресцентно-меченых красителями цианинового ряда Cy5, при их встраивании в цепь ДНК в процессе рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA).

Методы. В работе использовали метод RPA в режиме реального времени. Для контроля качества получаемых продуктов амплификации использовали метод горизонтального электрофореза.

Результаты. Исследовано влияние строения флуорофора и длин линкеров между красителем и азотистым основанием нуклеотида, а также вторым гетероциклом флуорофора и четвертичной аммониевой группой, на субстратные свойства для дезоксинуклеозидтрифосфатов Cy5-dUTP и Cy5-dCTP. Определены значения параметров субстратной эффективности: эффективности амплификации (кинетического показателя), а также нормированного выхода продукта и коэффициента встраивания.

Выводы. Модифицированные дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) с длинными линкерами между флуорофором и азотистым основанием нуклеотида, а также между четвертичной аммониевой группой и вторым гетероциклом флуорофора, показывали большую субстратную эффективность, в отличие от флуоресцентно-меченых dNTP с короткими линкерами. Модифицированные dU в каждой паре демонстрировали большую субстратную эффективность по сравнению с модифицированными dC.

Ключевые слова

рекомбиназная полимеразная амплификация, флуоресцентно-меченые
дезоксинуклеозидтрифосфаты

Поступила: 16.05.2024

Доработана: 05.08.2024

Принята в печать: 10.09.2024

Для цитирования

Епифанов А.С., Шершов В.Е., Суржиков С.А., Чудинов А.В., Лапа С.А. Исследование субстратных свойств флуоресцентно-меченых пиримидинтрифосфатов в рекомбиназной полимеразной амплификации. *Тонкие химические технологии*. 2024;19(5):408–417. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-5-408-417>

RESEARCH ARTICLE

Investigation of the substrate properties of fluorescently labeled pyrimidine triphosphates in recombinase polymerase amplification

Aleksei S. Epifanov✉, Valeriy E. Shershov, Sergey A. Surzhikov, Alexander V. Chudinov, Sergey A. Lapa
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

✉ Corresponding author; e-mail: alex.E.797@yandex.ru

Abstract

Objectives. To study the substrate properties of Cy5-labeled deoxynucleoside triphosphates of various natures (dU and dC) in the process of incorporation in the DNA chain during recombinase polymerase amplification (RPA).

Methods. The work used the real-time RPA method. The method of horizontal electrophoresis was used to control the quality of the amplification products obtained.

Results. The influence of the fluorophore structure and linker lengths on the substrate properties for deoxynucleoside triphosphates Cy5-dUTP and Cy5-dCTP was studied. The following values of the substrate efficiency parameters were determined: amplification efficiency (kinetic indicator), normalized product yield, and embedding coefficient.

Conclusions. Modified deoxynucleoside triphosphates (dNTP) with long linkers between the fluorophore and the nitrogenous base, as well as between the quaternary ammonium group and the second heterocycle of the fluorophore, showed greater substrate efficiency than fluorescently labeled dNTP with short linkers. The modified dU in each pair demonstrated greater substrate efficiency compared to the modified dC.

Keywords

recombinase polymerase amplification, fluorescently labeled deoxynucleoside triphosphates

Submitted: 16.05.2024

Revised: 05.08.2024

Accepted: 10.09.2024

For citation

Epifanov A.S., Shershov V.E., Surzhikov S.A., Chudinov A.V., Lapa S.A. Investigation of the substrate properties of fluorescently labeled pyrimidine triphosphates in recombinase polymerase amplification. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2024;19(5):408–417. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-5-408-417>

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентное мечение нуклеиновых кислот в настоящее время широко используется в молекулярной биологии и медицинской диагностике. Модифицированные путем введения флуорофора дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) [1–4], чаще пиримидиновой природы, применяются для введения в ДНК непосредственно в процессе амплификации, что значительно упрощает процедуру анализа продуктов амплификации с использованием иммобилизованной фазы (на биологических микрочипах, различных стрип-системах и т.п.) [5]. Используемые для получения флуоресцентно-меченых ДНК флуорофоры должны обладать требуемыми свойствами: химической стабильностью, низкой фоновой флуоресценцией, устойчивостью к многократному облучению (флуоресценции). К таким меткам относятся

производные дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, модифицированные красителями цианинового ряда Cy5 (Cy5-dNTP) [6], где флуорофор прикреплен через линкер к азотистому основанию нуклеотида [7–9]. Широкое применение флуоресцентно-меченых трифосфатов нуклеозидов в составе молекулярно-биологических систем диагностики делает крайне важным изучение их совместимости с ферментативными системами [2, 3, 10].

Цель данной работы — изучить субстратные свойства флуоресцентно-меченых dNTP пиримидиновой природы (dU и dC) в ферментативной системе рекомбиназной полимеразной амплификации (recombinase polymerase amplification, RPA) [11–13]. В качестве бактериальной генетической мишени для изучения субстратной эффективности Cy5-dUTP и Cy5-dCTP выбран фрагмент гена *ebpS* возбудителя пневмонии человека *Staphylococcus aureus*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы ДНК. В работе использовали деконтаминированную ДНК *Staphylococcus aureus*, полученную из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Московская область, пос. Оболensk).

ПЦР. Для наработки целевого фрагмента гена *ebpS* использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакционная смесь (30 мкл) содержала смесь природных dNTPs в концентрации 0.2 mM; видоспецифичные праймеры: прямой (5'-TTAGAAGCGTCTTTAGATGTGTC-3') и обратный (5'-GGAACAGCGGGTGTTCAGGTGC-3'); 5U Taq-ДНК-полимеразу (*Thermo Scientific*, США) и соответствующий ей реакционный буфер в количестве, рекомендованном производителем. Амплификацию проводили на приборе Gentier 96E (*Tianlong*, Китай) по следующей программе: предварительный нагрев при 95°C в течение 3 мин, затем 32 цикла: 95°C в течение 20 с, 60°C в течение 30 с, 72°C в течение 30 с. После этого проводили завершающую инкубацию при 72°C в течение 3 мин. Полученный ПЦР-продукт длиной 497 пар нуклеотидов (п.н.) очищали и выделяли согласно методу, указанному в [14], после чего использовали в RPA для изучения кинетических характеристик и субстратных свойств.

RPA в режиме реального времени. Реакционная смесь (50 мкл) содержала компоненты набора TwistAmp Basic (*TwistDX*, Великобритания) в рекомендованных производителем концентрациях; реагенты набора с добавлением пары праймеров: прямого (5'-CTCCAAATATCGCTAATGCACCGATAATTAGTACAGCTGC-3') и обратного (5'-ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCTAAAGA-3'), интеркалирующего красителя EvaGreen (*Biotium*, США) и очищенного ПЦР-продукта в количестве 1 мкл входили в общую смесь, которую после аккуратного перемешивания разливали по реакционным пробиркам объемом 200 мкл с лиофилизатом из набора. Флуоресцентно-меченые трифосфаты вводили в реакционный объем в концентрации 8 мкМ. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Gentier 96E (*Tianlong*, Китай) в режиме реального времени по программе: 50 мин при 40°C и съемке сигнала флуоресценции 1 раз в минуту. Накопление продукта реакции визуализировали с помощью интеркалирующего красителя. Полученный RPA-продукт длиной 282 п.н. очищали и выделяли согласно методу, указанному в [14].

Горизонтальный электрофорез для контроля продуктов RPA. Продукты RPA разделяли в 4%-ном агарозном геле Agarose LE (*Helicon*, Россия) в течение 5 мин при 5 В/см, далее 50 мин при 10 В/см, для окрашивания использовали SYBR Green I (*Molecular Probes*, США). Для детекции ДНК по окрашиванию SYBR Green I проводили визуализацию на системе гель-документирования ChemiScope 6200 Touch (*Clinx Science Instruments*, Китай) с помощью встроенных LED-светодиодов и светофильтров «Green light excitation/emission», спектр возбуждения которых соответствует красителю Cy3 ($\lambda_{\text{макс.возб.}} = 550$ нм, $\lambda_{\text{макс.исп.}} = 570$ нм). Для избирательной детекции метки, встроившейся в ДНК, использовали светофильтры «Red light excitation/emission», спектр возбуждения которых аналогичен красителю Cy5 ($\lambda_{\text{макс.возб.}} = 650$ нм, $\lambda_{\text{макс.исп.}} = 670$ нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения сравнительного анализа субстратной эффективности флуоресцентно-меченых нуклеотидов использовали dNTP (рис. 1), содержащие в своей структуре цвиттер-ионные индодикарбоцианиновые красители, различающиеся пространственной структурой флуорофора [7], длиной линкера между красителем и азотистым основанием нуклеотида, вторым гетероциклом флуорофора и четвертичной аммониевой группой.

Для флуоресцентно-меченых производных в каждой паре (dU и dC) были введены обозначения в зависимости от длины двух линкеров. Для линкера, соединяющего ароматическую группу красителя с азотистым основанием нуклеотида, приняли следующую нумерацию: (1) для короткого и (2) для длинного. Линкер, соединяющий второй гетероцикл

флуорофора с четвертичной аммониевой группой, обозначили как (a) для короткого и (b) для длинного.

Анализ кинетики амплификации в присутствии Cy5-dNTP проводили методом RPA в режиме реального времени.

За контроль сравнения был взят образец, обозначенный как dU-K. Его выбор был продиктован широким применением в технологии гелевых биологических микрочипов благодаря хорошей субстратной эффективности [5]. Он, как и исследуемые образцы, характеризуется электронейтральным строением флуорофора.

Для анализа кинетики амплификации фрагмента ДНК в качестве рабочей концентрации исследуемых меченых dNTP выбрали 8 мкМ для обеспечения частичного замещения природных трифосфатов при формировании растущей цепи ДНК. Амплификацию проводили в присутствии всех четырех природных

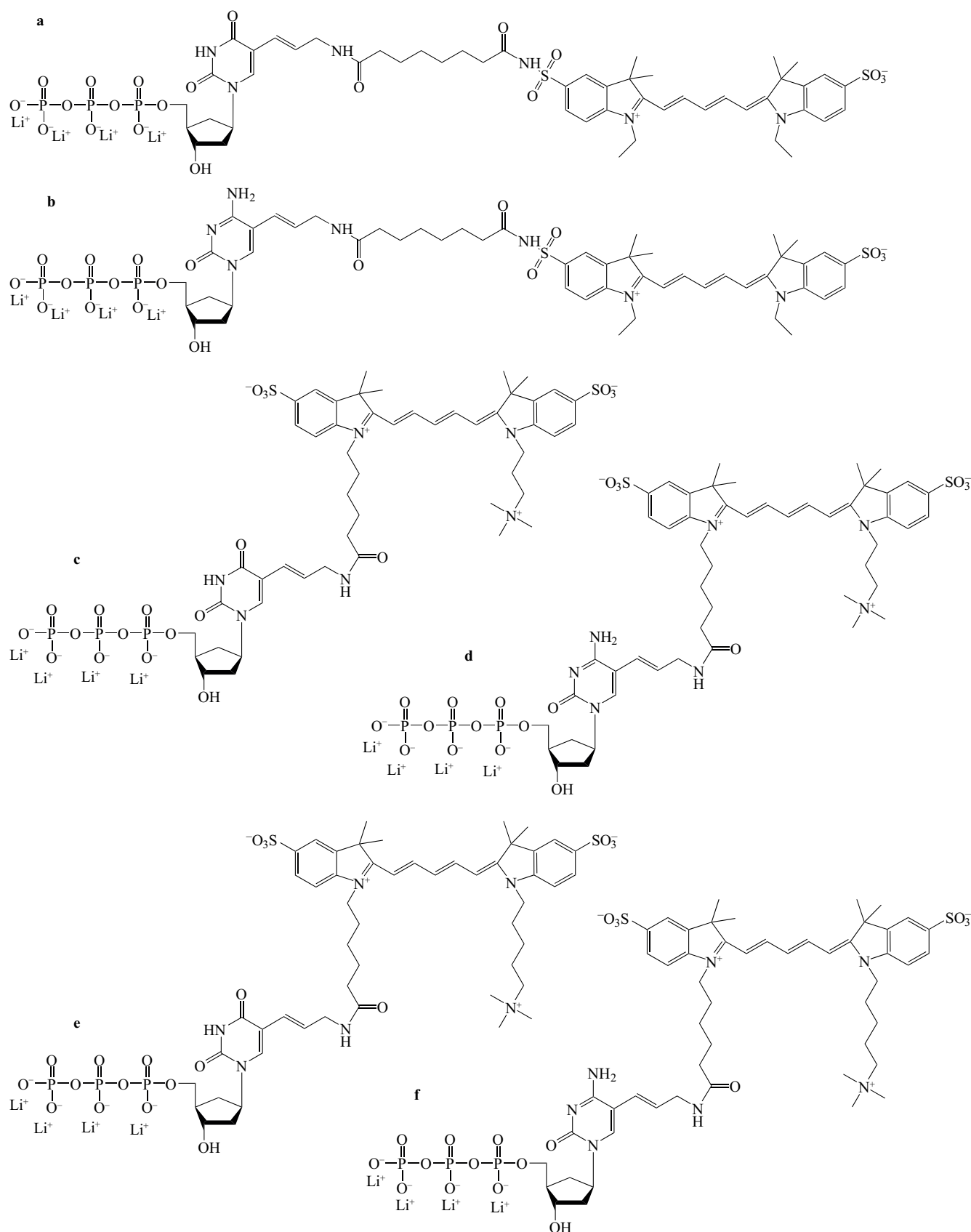


Рис. 1. Структура флуоресцентно-меченых дезоксиуридин- и дезоксицитидинтрифосфатов:
(a) dU-K; (b) dC-K; (c) U1a; (d) C1a; (e) U1b; (f) C1b

Fig. 1. Structure of fluorescently labeled deoxyuridine and deoxycytidine triphosphates:
(a) dU-K; (b) dC-K; (c) U1a; (d) C1a; (e) U1b; (f) C1b

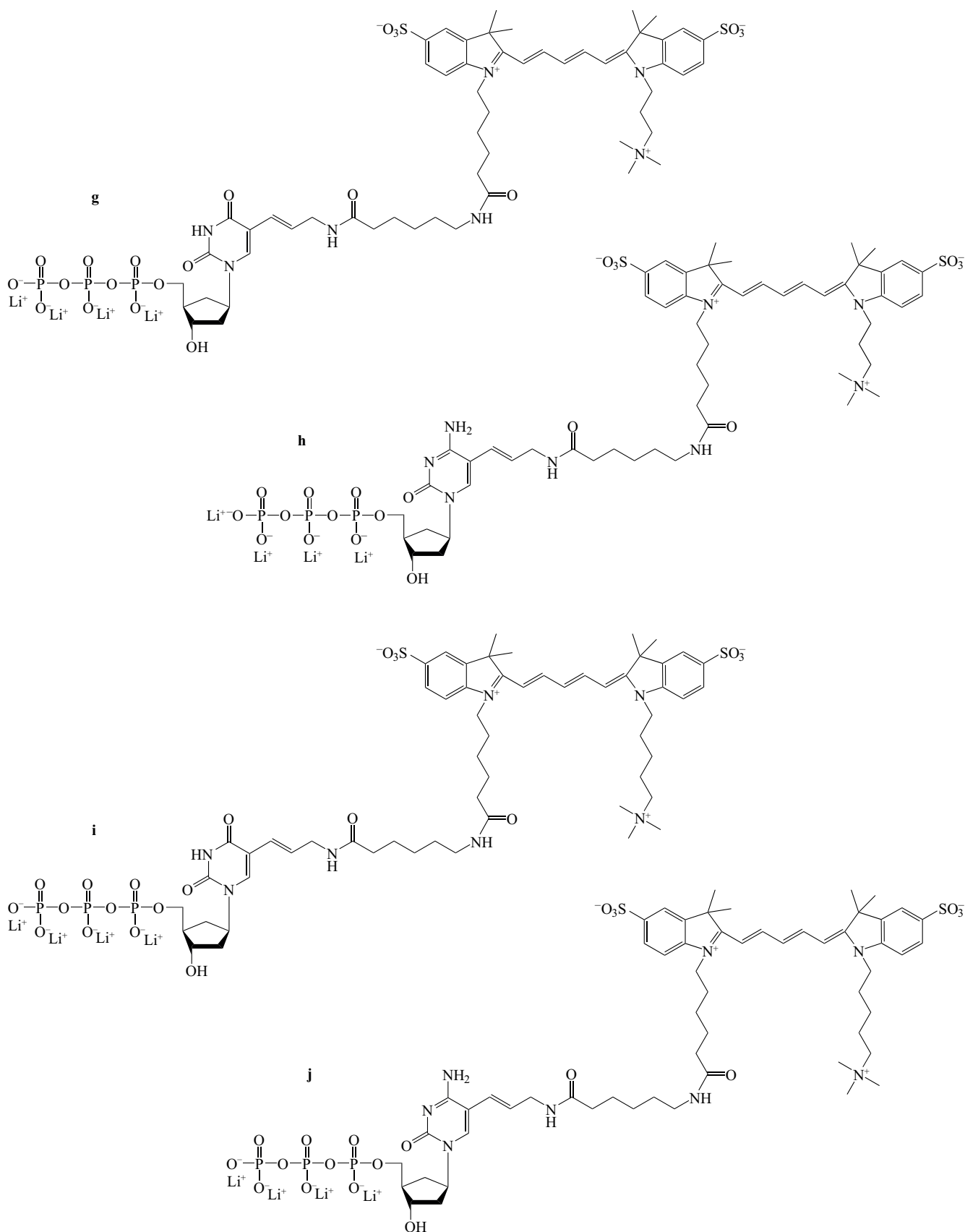


Рис. 1. Строение флуоресцентно-меченых дезоксиуридин- и дезоксицитидинтрифосфатов:
(**g**) U2a; (**h**) C2a; (**i**) U2b; (**j**) C2b

Fig. 1. Structure of fluorescently labeled deoxyuridine and deoxycytidine triphosphates:
(**g**) U2a; (**h**) C2a; (**i**) U2b; (**j**) C2b

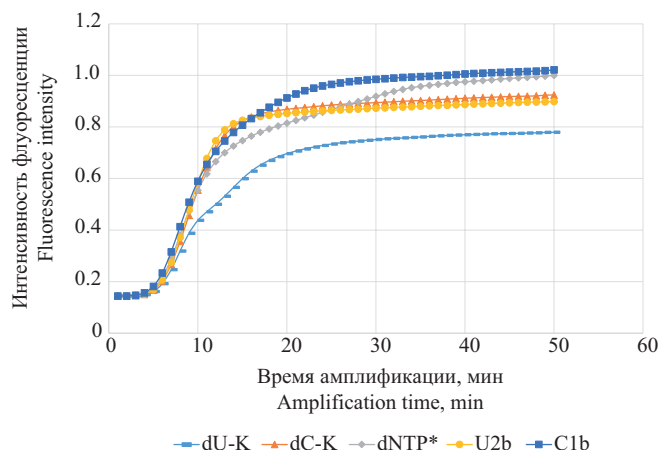


Рис. 2. Кинетика накопления сигнала флуоресценции в присутствии модифицированных dU и dC (на примере U2b и C1b).
*Немодифицированные дезоксинуклеозидтрифосфаты

Fig. 2. Kinetics of fluorescence signal accumulation in the presence of modified dU and dC (case study of U2b and C1b).
*Unmodified deoxynucleoside triphosphates

dNTP в концентрации 200 мкМ в трех повторях для каждого из исследуемых меченых dU и dC (рис. 2). В качестве контрольного образца использовали реакционную смесь, содержащую только немодифицированные (природные) dNTP в концентрации 200 мкМ.

Определение эффективности амплификации в процессе RPA (E_f) проводили с использованием угла наклона прямого участка S-образной кривой накопления сигнала в логарифмическом масштабе, по методике, используемой для ПЦР [15]. Литера t подразумевает построение графиков по времени проведения реакции ввиду отсутствия циклов, как в ПЦР (E).

Было изучено влияние линкеров различной длины на ингибирование полимераз ферментативной системы RPA, экспериментальные данные приведены в таблице. По полученным данным видно, что эффективность амплификации для каждого из Cy5-dNTP была ниже по сравнению с природными dNTP (за исключением U1b, C2a), что свидетельствует об ингибировании. Не было обнаружено существенного влияния длины линкера, соединяющего ароматическую группу красителя с азотистым основанием нуклеотида, на эффективность амплификации. Увеличение длины линкера, соединяющего второй гетероцикл флуорофора с четвертичным амином, привело к более выраженному влиянию ингибирующего эффекта, модифицированного dC по сравнению с парным dU.

Для оценки выхода продукта амплификации ввели нормированный условный выход продукта (η) по яркости пикселей (интенсивность сигнала пикселей анализируемого участка изображения) соответствующей полосы на электрофореграмме.

Нормировку производили для наглядности влияния Cy5-(dU, dC) на процесс амплификации по сравнению с контрольным образцом (природными dNTP). Нормированный условный выход продукта определяли по яркости пикселей полос продукта амплификации на агарозном геле при пересчете на полосу контроля. Исследуемый флуоресцентно-меченый субстрат не оказывал существенного влияния на выход продукта (за исключением U1b).

Измерение яркости пикселей в условных единицах (у.е.) проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США) (табл.) и использовали для определения нормированного условного выхода продукта и коэффициента встраивания метки.

Для оценки встраивания флуоресцентно-меченых dNTP в растущую цепь ДНК ввели коэффициент встраивания (K_{in}), который представляет собой отношение суммарной яркости пикселей зоны фореграммы, соответствующей полосе меченого продукта амплификации, снятой на канале Cy5, к яркости той же полосы, снятой на канале Cy3 (табл.). Проводили три серии RPA для каждой пары флуоресцентно-меченых трифосфатов.

Из полученных данных видно, что все модифицированные dU встраиваются в ДНК лучше по сравнению со своими аналогами Cy5-dC. Выявлено, что увеличение линкера, соединяющего второй гетероцикл флуорофора с четвертичной аммониевой группой, значительно повышает долю встраивания флуоресцентно-меченых dNTP. Увеличение длины линкера, соединяющего ароматическую группу красителя с азотистым основанием нуклеотида, оказывало не столь значительное влияние на субстратные характеристики.

Таблица. Эффективность амплификации (E_t), нормированный выход продукта (η), коэффициент встраивания (K_{in}), полученные при помощи RPA с введением в реакционную смесь Cy5-dU и Cy5-dC

Table. Amplification efficiency (E_t), normalized product yield (η), coefficient of incorporation (K_i) obtained for RPA with Cy5-dU and Cy5-dC

№ dNTP	Эффективность амплификации $E_t \pm \sigma^{**}$ Amplification efficiency $E_t \pm \sigma^{**}$	Нормированный выход продукта $\eta \pm \sigma^{**}$ Normalized product yield $\eta \pm \sigma^{**}$	Коэффициент встраивания $K_{in} \pm \sigma^{**}$ Coefficient of incorporation $K_{in} \pm \sigma^{**}$
dNTP*	1.35 ± 0.02	1.00 ± 0.00	–
dU-K	1.27 ± 0.06	0.76 ± 0.25	1.74 ± 0.07
dC-K	1.29 ± 0.02	0.97 ± 0.17	0.50 ± 0.07
U1a	1.28 ± 0.01	0.96 ± 0.06	0.27 ± 0.05
C1a	1.28 ± 0.03	0.98 ± 0.11	0.17 ± 0.04
U1b	1.34 ± 0.06	0.77 ± 0.29	0.94 ± 0.13
C1b	1.33 ± 0.03	1.18 ± 0.58	0.35 ± 0.04
U2a	1.33 ± 0.04	0.99 ± 0.34	0.29 ± 0.10
C2a	1.35 ± 0.07	0.88 ± 0.14	0.23 ± 0.03
U2b	1.33 ± 0.03	0.84 ± 0.34	0.87 ± 0.21
C2b	1.28 ± 0.02	1.10 ± 0.51	0.68 ± 0.47

*Немодифицированные дезоксирибонуклеотидтрифосфаты. / Unmodified deoxynucleoside triphosphates.

**Среднее квадратическое отклонение. / The mean square deviation.

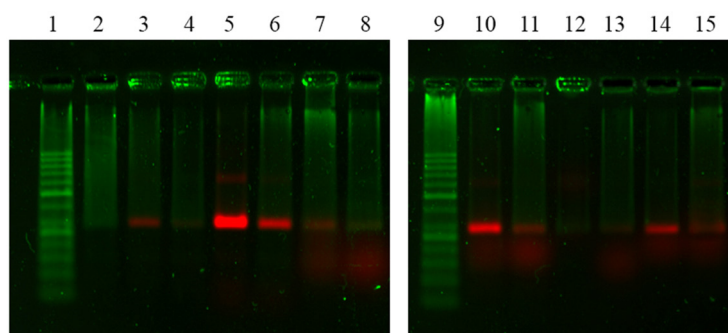


Рис. 3. Электрофореграмма, полученная в цифровом формате TIFF24 с сохранением данных попиксельной интенсивности сигнала для измерения коэффициента встраивания (K_{in}) продукта RPA: (1) маркер длин двухцепочечных ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, США); (2) dNTP (только природные, контроль реакции); (3) лабораторный контроль mod-U1, не рассматривается в данном исследовании; (4) лабораторный контроль mod-C1, не рассматривается в данном исследовании; (5) dU-K; (6) dC-K; (7) U1a; (8) C1a; (9) маркер длин двухцепочечных ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, США); (10) U2a; (11) C2a; (12) U1b; (13) C1b; (14) U2b; (15) C2b

Fig. 3. Electrophoregram obtained in digital TIFF 24 format with saving pixel-by-pixel signal intensity data for measuring the embeddability coefficient (K_{in}) of the RPA product: (1) marker of the lengths of double-stranded DNA GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, USA); (2) dNTP; (3) laboratory control mod-U1, not considered in this study; (4) laboratory control mod-C1, not considered in this study; (5) dU-K; (6) dC-K; (7) U1a; (8) C1a; (9) marker of the lengths of double-stranded DNA GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, USA); (10) U2a; (11) C2a; (12) U1b; (13) C1b; (14) U2b; (15) C2b

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование показало, что пространственная структура флуорофора и различия в длинах линкеров влияют на субстратные характеристики

модифицированных dNTP. Обнаружено, что флуоресцентно-меченые трифосфаты с длинным линкером, соединяющим азотистое основание нуклеотида с ароматической группой красителя, и длинным линкером, соединяющим второй гетероцикл флуорофора

с четвертичной аммониевой группой, значительно лучше встраиваются в растущую цепь ДНК и характеризуются высоким выходом продукта.

Благодарности

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-14-00257.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-14-00257.

Вклад авторов

А.С. Епифанов — проведение исследований, подготовка рукописи.

В.Е. Шершов — синтез флуоресцентно-меченых dNTPs.

С.А. Суржиков — синтез праймеров.

А.В. Чудинов — научное консультирование.

С.А. Лапа — конструирование праймеров для ПЦР и RPA, планирование экспериментов, редактирование рукописи.

Authors' contributions

A.S. Epifanov — conducting research, writing the text of the manuscript.

V.E. Shershov — synthesis of fluorescently labeled dNTPs.

S.A. Surzhikov — synthesis of primers.

A.V. Chudinov — academic advising.

S.A. Lapa — construction of primers for PCR and RPA, planning experiments, and editing the manuscript.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boháčová S., Ludvíková L., Poštová Slavětínská L., Vaníková Z., Klán P., Hocek M. Protected 5-(hydroxymethyl)-uracil nucleotides bearing visible-light photocleavable groups as building blocks for polymerase synthesis of photocaged DNA. *Org. Biomol. Chem.* 2018;16(9):1527–1535. <https://doi.org/10.1039/c8ob00160j>
2. Dziuba D., Pohl R., Hocek M. Bodipy-labeled nucleoside triphosphates for polymerase synthesis of fluorescent DNA. *Bioconjug. Chem.* 2014;25(11):1984–1995. <https://doi.org/10.1021/bc5003554>
3. Wynne S.A., Pinheiro V.B., Holliger P., Leslie A.G.W. Structures of an Apo and a Binary Complex of an Evolved Archeal B Family DNA Polymerase Capable of Synthesising Highly Cy-Dye Labelled DNA. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e70892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070892>
4. Ramsay N., Jemth A.S., Brown A., Crampton N., Dear P., Holliger P. CyDNA: Synthesis and Replication of Highly Cy-Dye Substituted DNA by an Evolved Polymerase. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132(14):5096–5104. <https://doi.org/10.1021/ja909180c>
5. Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A., Stomahin A.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. Comparative Study of Novel Fluorescent Cyanine Nucleotides: Hybridization Analysis of Labeled PCR Products Using a Biochip. *J. Fluoresc.* 2017;27(6):2001–2016. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2139-6>
6. Bertocchi F., Delledonne A., Vargas-Nadal G., Terenziani F., Painelli A., Sissa C. Aggregates of Cyanine Dyes: When Molecular Vibrations and Electrostatic Screening Make the Difference. *J. Phys. Chem. C*. 2023;127(21):10185–10196. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c01253>
7. Шершов В.Е., Лапа С.А., Левашова С.А., Шишкин И.Ю., Штылев Г.Ф., Шекалова Е.Ю., Василисков В.А., Заседателев А.С., Кузнецова В.Е., Чудинов А.В. Синтез флуоресцентно-меченых нуклеотидов для маркирования продуктов изотермической амплификации. *Биоорганическая химия*. 2023;49(6):649–656. <https://doi.org/10.31857/S0132342323050056>

REFERENCES

1. Boháčová S., Ludvíková L., Poštová Slavětínská L., Vaníková Z., Klán P., Hocek M. Protected 5-(hydroxymethyl)-uracil nucleotides bearing visible-light photocleavable groups as building blocks for polymerase synthesis of photocaged DNA. *Org. Biomol. Chem.* 2018;16(9):1527–1535. <https://doi.org/10.1039/c8ob00160j>
2. Dziuba D., Pohl R., Hocek M. Bodipy-labeled nucleoside triphosphates for polymerase synthesis of fluorescent DNA. *Bioconjug. Chem.* 2014;25(11):1984–1995. <https://doi.org/10.1021/bc5003554>
3. Wynne S.A., Pinheiro V.B., Holliger P., Leslie A.G.W. Structures of an Apo and a Binary Complex of an Evolved Archeal B Family DNA Polymerase Capable of Synthesising Highly Cy-Dye Labelled DNA. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e70892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070892>
4. Ramsay N., Jemth A.S., Brown A., Crampton N., Dear P., Holliger P. CyDNA: Synthesis and Replication of Highly Cy-Dye Substituted DNA by an Evolved Polymerase. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132(14):5096–5104. <https://doi.org/10.1021/ja909180c>
5. Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A., Stomahin A.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. Comparative Study of Novel Fluorescent Cyanine Nucleotides: Hybridization Analysis of Labeled PCR Products Using a Biochip. *J. Fluoresc.* 2017;27(6):2001–2016. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2139-6>
6. Bertocchi F., Delledonne A., Vargas-Nadal G., Terenziani F., Painelli A., Sissa C. Aggregates of Cyanine Dyes: When Molecular Vibrations and Electrostatic Screening Make the Difference. *J. Phys. Chem. C*. 2023;127(21):10185–10196. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c01253>
7. Shershov V.E., Lapa S.A., Levashova A.I., et al. Synthesis of Fluorescent-Labeled Nucleotides for Labeling of Isothermal Amplification Products. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023;49(5):1115–1158. <https://doi.org/10.1134/S1068162023050242>

8. Telser J., Cruickshank K.A., Morrison L.E., Netzel T.L. Synthesis and characterization of DNA oligomers and duplexes containing covalently attached molecular labels: comparison of biotin, fluorescein, and pyrene labels by thermodynamic and optical spectroscopic measurements. *J. Am. Chem. Soc.* 1989;111(18):6966–6976. <https://doi.org/10.1021/ja00200a011>
9. Ren X., El-Sagheer A.H., Brown T. Efficient enzymatic synthesis and dual-colour fluorescent labelling of DNA probes using long chain azido-dUTP and BCN dyes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(8):e79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw028>
10. Лапа С.А., Волкова О.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Эффективность амплификации и субстратные свойства флуоресцентно-меченных трифосфатов дезоксиуридина в ПЦР с ДНК-полимеразами, не обладающими 3'-5'-экзонуклеазной. *Биоорганическая химия.* 2019;45(4):392–402. <https://doi.org/10.1134/S0132342319040043>
11. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006;4(7):e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
12. Бондарева О.С., Батурин А.А., Миронова А.В. Рекомбиназная полимеразная амплификация: характеристика метода и применение в диагностике инфекционных заболеваний. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024;101(2):270–280. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-470>
13. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt. Chem.* 2018;98:19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
14. Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммура Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека. *Молекулярная биология.* 2021;55(6):944–955. <https://doi.org/10.31857/S0026898421050062>
15. Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F. Assumption – free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 2003;339(1):62–66. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01423-4)
- [Original Russian Text: Shershov V.E., Lapa S.A., Levashova A.I., Shishkin I.Yu., Shtylev G.F., Shekalova E.Yu., Vasiliskov V.A., Zasedatelev A.S., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V. Synthesis of Fluorescent-Labeled Nucleotides for Labeling of Isothermal Amplification Products. *Биоорганическая химия.* 2023;49(6):649–656 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0132342323050056>
8. Telser J., Cruickshank K.A., Morrison L.E., Netzel T.L. Synthesis and characterization of DNA oligomers and duplexes containing covalently attached molecular labels: comparison of biotin, fluorescein, and pyrene labels by thermodynamic and optical spectroscopic measurements. *J. Am. Chem. Soc.* 1989;111(18):6966–6976. <https://doi.org/10.1021/ja00200a011>
9. Ren X., El-Sagheer A.H., Brown T. Efficient enzymatic synthesis and dual-colour fluorescent labelling of DNA probes using long chain azido-dUTP and BCN dyes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(8):e79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw028>
10. Lapa S.A., Volkova O.S., Spitsyn M.A., *et al.* Amplification Efficiency and Substrate Properties of Fluorescently Labeled Deoxyuridine Triphosphates in PCR in the Presence of DNA Polymerases without 3'-5' Exonuclease Activity. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019;45(4):263–272 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S1068162019040046>
- [Original Russian Text: Lapa S.A., Volkova O.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. Amplification Efficiency and Substrate Properties of Fluorescently Labeled Deoxyuridine Triphosphates in PCR in the Presence of DNA Polymerases without 3'-5' Exonuclease Activity. *Биоорганическая химия.* 2019;45(4):392–402 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0132342319040043>
11. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006;4(7):e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
12. Bondareva O.S., Baturin A.A., Mironova A.V. Recombinase polymerase amplification: method's characteristics and applications in diagnostics of infectious diseases. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2024;101(2):270–280 (in Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-470>
13. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt. Chem.* 2018;98:19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
14. Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., *et al.* Development of Multiplex RT-PCR with Immobilized Primers for Identification of Infectious Human Pneumonia Pathogens. *Mol. Biol.* 2021;55(6):828–838. <https://doi.org/10.1134/S002689321040063>
- [Original Russian Text: Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., Ammour Yu.I., Blagodatskikh S.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. Development of Multiplex RT-PCR with Immobilized Primers for Identification of Infectious Human Pneumonia Pathogens. *Молекулярная биология.* 2021;55(6):944–955 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0026898421050062>
15. Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F. Assumption – free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 2003;339(1):62–66. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01423-4)

Об авторах

Епифанов Алексей Сергеевич, лаборант, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: alex.E.797@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0005-5604-8171>

Шершов Валерий Евгеньевич, научный сотрудник, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: shershov@list.ru. Scopus Author ID 55581995700, SPIN-код РИНЦ 9183-7807, <https://orcid.org/0000-0003-3308-7133>

Суржиков Сергей Алексеевич, к.х.н., старший научный сотрудник, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: ssergey77@mail.ru. Scopus Author ID 7006525454, SPIN-код РИНЦ 5012-0760, <https://orcid.org/0000-0002-6043-1182>

Чудинов Александр Васильевич, к.х.н., заведующий лабораторией, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: chud@eimb.ru. Scopus Author ID 7003833018, SPIN-код РИНЦ 8357-4576, <https://orcid.org/0000-0001-5468-4119>

Лапа Сергей Анатольевич, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: lapa@biochip.ru. Scopus Author ID 6603461000, SPIN-код РИНЦ 3809-6735, <https://orcid.org/0000-0002-9011-134X>

About the authors

Aleksei S. Epifanov, Laboratory Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: alex.E.797@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0005-5604-8171>

Valeriy E. Shershov, Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: shershov@list.ru. Scopus Author ID 55581995700, RSCI SPIN-code 9183-7807, <https://orcid.org/0000-0003-3308-7133>

Sergey A. Surzhikov, Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: ssergey77@mail.ru. Scopus Author ID 7006525454, RSCI SPIN-code 5012-0760, <https://orcid.org/0000-0002-6043-1182>

Alexander V. Chudinov, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Laboratory, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: chud@eimb.ru. Scopus Author ID 7003833018, RSCI SPIN-code 8357-4576, <https://orcid.org/0000-0001-5468-4119>

Sergey A. Lapa, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: lapa@biochip.ru. Scopus Author ID 6603461000, RSCI SPIN-code 3809-6735, <https://orcid.org/0000-0002-9011-134X>