

# ВНУТРІШНЬМОЛЕКУЛЯРНІ ВЗАЄМОДІЇ В СИСТЕМІ ФЛУОРОФОР – ГАСНИК У ЛІНІЙНИХ ТА ШПИЛЬКОВИХ ЗОНДАХ ДЛЯ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

О.Ю. ЛИМАНСЬКА<sup>1,\*</sup>, О.П. ЛИМАНСЬКИЙ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Національної академії аграрних наук України, вул. Пушкінська, 83, Харків, 61023, Україна

<sup>2</sup> Інститут фізіологічно активних сполук, пр. Науки, 58, Харків, 61072, Україна

E-mail: olgaliman@ukr.net, apliman@ukr.net

*Шпильковий зонд порівняно з лінійним в умовах проведення ПЛР-РЧ характеризується вищою ефективністю гасіння флуоресценції, що веде до нижчого фонового рівня флуоресценції та, отже, більшого співвідношення сигнал/шум при проведенні ПЛР у реальному часі. Проведено експериментальне порівняння ефективності гасіння флуоресценції двох олігонуклеотидних зондів в різних конформаціях – шпилькового у форматі молекулярного маяка та лінійного у форматі TaqMan. Існує різниця у взаємодії гасника з флуорофором для зондів різної конформації. Для лінійного зонда гасіння відбувається через механізм індуктивно-резонансного переносу енергії (ФРПЕ, або FRET), а для шпилькового зонда – за допомогою контактного гасіння через більш близьке розташування флуорофора та гасника, але можливим є й резонансний перенос енергії за механізмом Ферстера. Показано, що спектр поглинання для лінійного зонда практично збігається зі спектром поглинання олігонуклеотида, який представляє зонд без гасника, що вказує на динамічний (Ферстеровський) механізм переносу енергії. Навпаки, спектри поглинання для шпилькового зонда та олігонуклеотида, який представляє зонд без гасника, значно відрізняються, що свідчить про контактний механізм переносу енергії між флуорофором та гасником флуоресценції. Спектри флуоресценції зондів та їхніх комплексів з олігонуклеотидом, що є комплементарним лінійному зонду (та петлі шпилькового зонда), та ампліконом (довжиною 200 п.н., який містить ДНК-мішень для зондів) дозволили порівняти ці два зонди через порівняння радіусів міграції енергії, ефективності гасіння флуоресценції донора. Розрахований з експериментальних даних радіус міграції енергії R для шпилькового зонда становив 32,4 Å, а для лінійного зонда – 47,3 Å.*

**Ключові слова:** гасіння флуоресценції, флуоресцентний зонд, характеристика зонда, ПЛР у реальному часі, ФРПЕ, зв'язування олігонуклеотида, олігонуклеотидний дуплекс, спектри флуоресценції.

**Вступ.** Технології геномного аналізу патогенів людини і тварин полягають у розробці підходів,

заснованих на молекулярно-генетичному аналізі з використанням різних модифікацій методів ампліфікації нуклеїнових кислот. Крім широко відомої на теперішній час та популярної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), з'явилась низка нових методів. Це лігазна ланцюгова реакція, шпилькова ізотермальна ампліфікація в різних модифікаціях (LAMP, loop-mediated isothermal amplification) (Takayama et al, 2019), аель-специфічна ПЛР для детекції точкових мутацій, або одонуклеотидних поліморфізмів, зокрема, ARMS-ПЛР (ARMS – amplification refractory mutation system, система ампліфікації стійких мутацій) (Munoz et al, 2009), аель-специфічна ПЛР з LNA-модифікованими праймерами (LNA – locked nucleic acid, або замкнена нуклеїнова кислота) (Latorra, 2003; Vester, 2004), ПЛР з праймерами з хитними нуклеотидами (Wu, 1989; Wang, 2008; Yaku, 2008), ПЛР з блокуючими праймерами (Parsons et al, 2005).

Винахід зондів для ПЛР-РЧ у форматі молекулярних маяків понад 25 років тому (Tuagi et al, 1996) дозволив підняти кількісну та якісну детекцію молекул нуклеїнових кислот на більш високий рівень (Howell et al, 2002).

Наразі такі ампліфікаційні методи як ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ) з різними форматами флуоресцентних проб (зондів), ізотермальна ампліфікація широко використовують в низці наукових галузей, включаючи молекулярну біологію, молекулярну медицину, ветеринарію.

Основною метою таких флуоресцентних методів є вимірювання оптичного сигналу, який є залежним від гібридаційного стану нуклеїнової кислоти з ковалентно приєднаним флуорофором. При переході від двониткової молекули ДНК до одониткової молекули сигнал флуоресценції молекули репор-

терного флуорофора змінюється або зникає. Створення таких флуоресцентних олігонуклеотидних зондів включає вибір флуорофора, гасника та механізму гасіння.

При проведенні ПЛР-РЧ широко використовують флуоресцентно мічені лінійні зонди в форматі TaqMan, шпилькові зонди в форматі молекулярних маяків, скорпіонові зонди-праймери (Hadjinicolaou et al, 2009; Josefsen et al, 2009). Для кількісного вимірювання специфічних послідовностей нуклеїнових кислот, генотипування патогенів на основі детекції однонуклеотидних поліморфізмів розроблено низку аналітичних методів. До числа стандартних методів, які використовують з діагностичною метою, можна віднести ПЛР-РЧ з використанням барвника, що інтеркалює, з високим квантовим виходом люмінесценції, специфічного до двониткової ДНК (наприклад, SYBR Green I, SYTO9), ПЛР-РЧ на підставі хімії Ферстеровського резонансного переносу енергії (ФРПЕ, FRET, або Forster resonance energy transfer).

Зонди у форматі молекулярних маяків представляють собою олігонуклеотиди, що утворюють шпильки, які флуоресцюють при гібридизації з РНК- або ДНК-мішенню (Ma et al, 2017). Петля шпильки (довжиною 15–30 нуклеотидів) визначає специфічність зонда. Технологія молекулярних маяків, або молекулярних шпильок, базується на зміні відповідної відстані між барвником, що флуоресцює, та гасником при зв'язуванні з ДНК-мішенню. В молекулі ДНК-зонда флуорофор та гасник, які приєднано до 5'- та 3'-кінців відповідно, у вихідному стані знаходяться близько один до одного, за рахунок чого досягається гасіння флуоресценції донорного флуорофора. Зміна структури зонда за рахунок гібридизації петлі шпильки з комплементарною ділянкою ДНК-мішені веде до різкого підсилення флуоресценції донора.

Домінуючим механізмом зменшення флуоресценції донорного флуорофора у вихідному стані для лінійного зонда є резонансний перенос енергії (ФРПЕ) від донорного до акцепторного флуорофора. Внаслідок зближення донора та акцептора (в якості якого може виступати гасник флуоресценції) до відстані 10–100 Å (Marras et al, 2002; Demchenko, 2009) інтенсивність флуоресценції акцепторного флуорофора збільшується, в той час як інтенсивність флуоресценції донора зменшується.

Ефективність гасіння шляхом резонансного переносу енергії істотним чином залежить від відстані між донором та акцептором та має місце при перекритті спектрів випромінювання донора та поглинання акцептора.

На відміну від лінійного зонда, для якого переважним механізмом гасіння є ФРПЕ, для шпилькового зонда (за відсутності гібридизації з ДНК-мішенню) домінуючим є контактний механізм гасіння флуоресценції зонда (Demchenko, 2009). Відмінною особливістю контактного механізму гасіння є та обставина, що гасіння флуоресценції флуорофорів відбувається рівною мірою та достатньо ефективно незалежно від перекриття їхніх спектрів випромінювання та поглинання.

Раніше нами розроблено систему праймерів та зондів (шпилькового та лінійного), які дозволяють проводити за допомогою ПЛР-РЧ ідентифікацію збудника сибірки *Bacillus anthracis* та його диференціацію від близькоспоріднених видів групи *Bacillus cereus sensu lato* (*B. cereus s.l.*) (Limanskaya et al, 2012). В даній роботі проведено експериментальне порівняння ефективності гасіння флуоресценції для двох олігонуклеотидних зондів в різних конформаціях – шпилькового у форматі молекулярного маяка та лінійного у форматі TaqMan.

Спектри флуоресценції зондів та їхніх комплексів з олігонуклеотидом, що є комплементарним лінійному зонду (та петлі шпилькового зонда), та ампліконом (довжиною 200 п.н., який містить ДНК-мішень для зондів) дозволили порівняти ці два зонди через визначені значення радіусів міграції енергії, ефективності гасіння флуоресценції донора.

Показано, що шпильковий зонд порівняно з лінійним характеризується вищою ефективністю гасіння флуоресценції, що веде до нижчого фоновому рівня флуоресценції при проведенні ПЛР у реальному часі.

Показано, що шпильковий зонд порівняно з лінійним характеризується вищою ефективністю гасіння флуоресценції, що веде до нижчого фоновому рівня флуоресценції при проведенні ПЛР у реальному часі.

**Матеріали і методи.** Олігонуклеотиди та олігонуклеотидні зонди. У роботі використано наступні олігонуклеотиди та олігонуклеотидні зонди:

1. 5'- gc ttt gaa tgc tag cac cag aag ctt gcg -3' (B6b),
2. 5'- FAM – cgcaagctctggtgctagcattcaaacg -3' (B5a),

3. 5'- FAM - cggcgcgcaagcttctggtgctagcattcaaagcc gccg-3' (B6a),
4. 5'- FAM — cgcaagcttctggtgctagcattcaaagc - RTQ1-3' (B5) (лінійний зонд; позиція 156–180 на гені *sspE*),
5. 5'- FAM - cggcgcgcaagcttctggtgctagcattcaaagcc gccg- RTQ1-3' (B6), (шпильковий зонд; позиція 156–180 на гені *sspE*), де FAM – флуоресцентний барвник ксантенового ряду О,О'-діпivaloїл-5-карбоксіфлуоресцеїн фосфорамід, RTQ1 – гасник флуоресценції.

Для шпилькового олігонуклеотидного зонда B6 підкреслено комплементарні фрагменти, що утворюють за рахунок інвертованого повтора стебло шпильки, петля якої є комплементарною до послідовності одониткової ДНК-мішені. Значення вільної енергії Гіббса  $\Delta G$ , що розраховано, для вторинної структури, яку утворено стеблом шпильки довжиною 5 пар нуклеотидів (п.н.) та петлею, становило  $-4,49$  ккал/моль за температури  $25^\circ\text{C}$  та іонної сили  $I = 60$  мМ  $\text{Na}^+$ .

Побудову вторинної структури молекул, визначення їхніх термодинамічних параметрів (температури плавлення,  $T_m$ , та вільної енергії,  $\Delta G$ ) здійснювали за допомогою програми Mfold ([www.unifold.org](http://www.unifold.org)) (Zuker, 2003).

Крім того, в якості ДНК-мішені для зондів використовували амплікон довжиною 200 п.н. (позиції 1–200 гена *sspE* хромосомної ДНК *B. anthracis*), отриманого після проведення ПЛР з набором праймерів Banssp7A-Banssp8, який дозволяє здійснювати видоспецифічну детекцію збудника сибірки *B. anthracis*.

Олігонуклеотиди (позиції 1–3 в наведеному вище списку) та олігонуклеотидні зонди (позиції 4–5) синтезовано фосфорамідним методом та очищено за допомогою електрофорезу в ПААГ або за допомогою послідовного проведення електрофорезу в ПААГ та ВЕРХ. Флуорофор було ковалентно приєднано до 5'-кінця, а гасник – до 3'-кінця олігонуклеотидів та зондів за допомогою аміногексаметилених лінкерів.

RTQ1 (Real-Time Quencher) – барвник, що не флуоресцює, з квантовим виходом флуоресценції менше 0,001 (Le Reste et al, 2012), який виступає гасником флуоресценції, що характеризується здатністю знижувати кванто-

вий вихід флуоресценції флуорофора FAM. Флуорофор FAM є електронним донором енергії, RTQ1 представляє акцептор у резонансному переносі електронної енергії від донора до акцептора в олігонуклеотидах за допомогою механізму Ферстера. Хромофор гасника переходить до збудженого стану при поглинанні фотонів та релаксує безвипромінено до основного стану.

**Спектральні вимірювання.** Спектри поглинання та флуоресценції записували на спектрофлуориметрі Perkin Elmer LS55 (Beaconsfield, Велика Британія). Довжина хвилі збудження – 440 нм, ширина щілини для збудження та випромінювання – 5 нм та 5 нм відповідно. Вимірювання проведено в трьох буферах: (i) 50 мМ какодilatний буфер (pH 6,5), (ii) 50 мМ трис-HCl (pH 8,5), (iii) 50 мМ трис-HCl (pH 8,5),  $2,5 \times 10^{-2}$  мМ  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,15 \times 10^{-2}$  мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,20 мМ KCl. Флуоресценцію для комплексів зонд – олігонуклеотид, зонд – амплікон реєстрували за температури  $25^\circ\text{C}$  через 30 хв по досягненні стабільного значення.

Олігонуклеотидні зонди та олігонуклеотиди було розчинено в деіонізованій воді (питомий опір 18 МОм  $\times$  см $^{-1}$ ), яку отримано на установці Super Q (Millipore, США), потім перенесено у відповідний буфер та розподілено на аліквоти. Гасіння флуоресценції донора (флуорофора FAM), яке викликано безвипроміненним переносом енергії від донора до акцептора (гасника флуоресценції RTQ1) та відбувається за Ферстеровським механізмом резонансного переносу енергії (Forster, 1948), визначається наступним рівнянням:

$$E = I - I_{DA}/I_D \quad (1)$$

де  $I_{DA}$  и  $I_D$  – інтенсивність флуоресценції донора в присутності та відсутності акцептора.

Ефективність гасіння флуоресценції обернено пропорційна відстані R між донором та акцептором:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (2)$$

де  $R_0$  – радіус Ферстера, що відповідає відстані між донором та акцептором, за якої ефективність переносу енергії становить 50 % (Demchenko, 2009);  $R$  – відстань між донором та акцептором. Значення  $R_0$ , що теоретично розраховано, визначається рівнянням Ферстера:

$$R_0 = (880 K^2 \times n^{-4} \times \Phi_d \times J)^{1/6} \times 10^{-5} \quad (3)$$

де  $K^2$  – коефіцієнт, що залежить від взаємної орієнтації моментів переходу молекул донора та акцептора ( $K^2 = 2/3$  для випадкової взаємної орієнтації диполів донора та акцептора);  $n$  – показник заломлення середовища, яке розділяє молекули донора та акцептора;  $\Phi_d$  – квантовий вихід флуоресценції донора;  $J$  – інтеграл перекриття нормалізованих спектрів флуоресценції донора та поглинання акцептора. Інтеграл перекриття зазначених спектрів розраховували за наведеної вище формули за допомогою програмного забезпечення Mathcad (PТC, США).

Для контактного механізму гасіння флуоресценції (у випадку шпилькового зонда) ефективність гасіння визначали шляхом ділення інтенсивності флуоресценції зонда в конформації шпильки на інтенсивність флуоресценції олігонуклеотида, який не містить гасник, множення результату ділення на 100 та віднімаючи його від 100.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Використання ПЛР-РЧ з зондами у форматах TaqMan та молекулярного маяка дає можливість проводити точну диференціацію, зокрема, бацил *B. anthracis* від близькоспоріднених видів групи *Bacillus cereus s.l.* (Limanskaya et al, 2012).

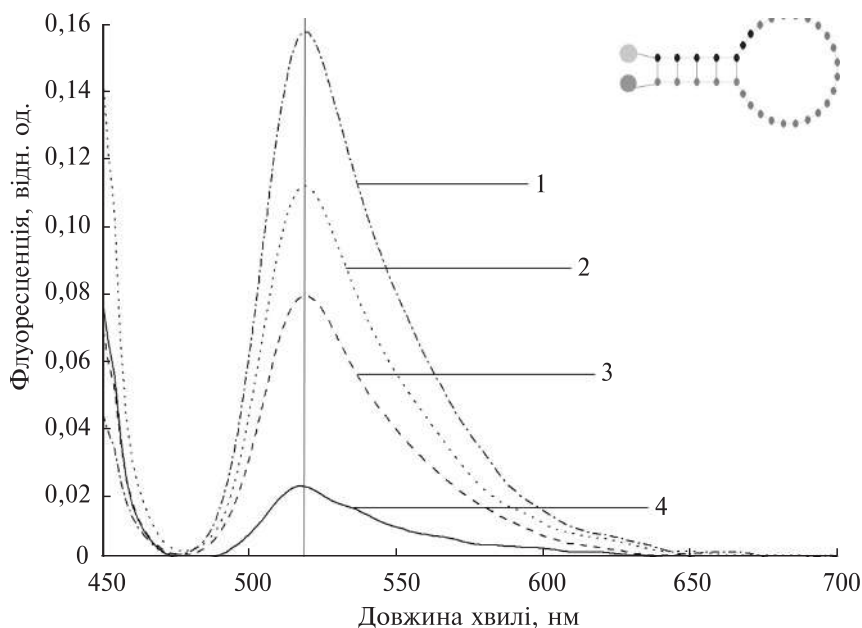
Для порівняння ефективності гасіння флуоресценції, що відбувається при взаємодії гасник – флуорофор, було сконструйовано два олігонуклеотидних зонди – лінійний у форматі TaqMan (B5) та шпильковий у форматі молекулярного маяка (B6). Шпильковий зонд представляє собою лінійний зонд (довжиною 20 нуклеотидів), який додатково містить на обох кінцях інвертований повтор довжиною 5 нуклеотидів, внутрішньомолекулярне самокомплементарне спарювання якого веде до утворення шпилькової структури. Через різну конформацію зондів взаємодія гасника з флуорофором для них відрізняється. Для лінійного зонда гасіння відбувається через механізм індуктивно-резонансного переносу енергії (ФРПЕ), а для шпилькового зонда – за допомогою контактного механізму через більш близьке розташування флуорофора та гасника, але можливим є й резонансний перенос енергії через механізм Ферстера.

При гібридизації шпилькового зонда з комплементарним фрагментом амплікона, що

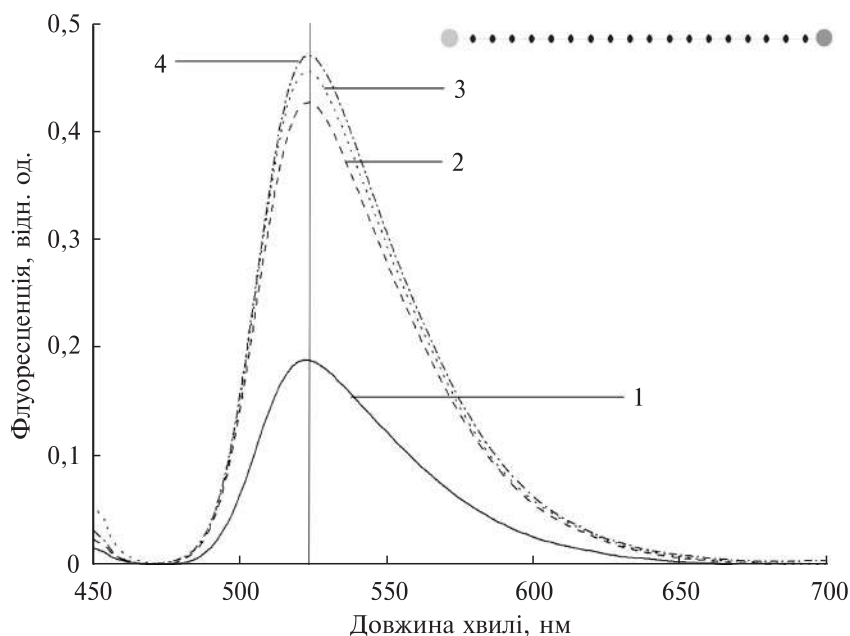
утворюється при проведенні ПЛР-РЧ, відстань між флуорофором та гасником збільшується. Через утворення олігодуплексу між одонитковим зондом та ниткою амплікона (Magas, 1965) збільшується твердість дуплекса, що утворився. Підвищення рівня флуоресценції, що при цьому відбувається, реєстрували в експерименті з використанням не тільки амплікона, що містить мішень для зонда, але й олігонуклеотида (B6b), який є комплементарним петлі шпилькового зонда (B6), а також лінійному зонду (B5). Незважаючи на те, що довжина стебла шпилькового зонда (B6) становить усього 5 п.н., стебло утримує флуорофор та гасник у тісному контакті, що проявляється в значному гасінні флуоресценції для вільного шпилькового зонда. При зв'язуванні з мішенню-олігонуклеотидом (рис. 1) конформація шпилькового зонда змінюється, в результаті чого гасник дистанційно віддаляється від флуорофора, що веде до відновлення його флуоресценції.

Теоретично визначена температура плавлення вторинної структури, яку утворює шпильковий зонд за іонної сили  $I = 60 \text{ mM Na}^+$  (за умов проведення ПЛР-РЧ), становить  $45,3 \text{ }^\circ\text{C}$ . Титрування мішенню-олігонуклеотидом за температури  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$  веде до часткового плавлення шпильки зонду за співвідношення молярної концентрації мішені-олігонуклеотида до такої шпилькового зонда 2 та 4 (рис. 1, крива 2 та крива 3). Повне розкриття стебла шпильки відбувається за співвідношення 6 (рис. 1, крива 4).

Для порівняння аналогічні спектральні вимірювання проведено для лінійного зонда (рис. 2), в якому знайдено недосконалу внутрішньомолекулярну шпильку (стебло містить неспарені нуклеотида),  $T_m$  якої дорівнює  $49,4 \text{ }^\circ\text{C}$ . На відміну від шпилькового зонда, вже за співвідношення молярної концентрації мішені-олігонуклеотида до такої лінійного зонда, що дорівнює 1 (рис. 2, крива 1), відбувається розкриття внутрішньомолекулярної шпильки на 92 % та утворення олігодуплекса. Це пояснюється через нижче значення вільної енергії для внутрішньомолекулярної шпильки лінійного зонда ( $\Delta G$  якої становить  $-2,40 \text{ ккал/моль}$  за температури  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  та іонної сили  $I = 60 \text{ mM Na}^+$ ) порівняно зі значенням вільної енергії для шпилькового зонда ( $\Delta G = -4,49 \text{ ккал/моль}$  за  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  та  $I = 60 \text{ mM Na}^+$ ).



**Рис. 1.** Спектри флуоресценції вільного **шпилькового зонда В6** (крива 1) та його комплексів з олігонуклеотидом В6b, комплементарним петлі шпильки зонда В6, за різних співвідношень молярної концентрації мішені-олігонуклеотида до такої шпилькового зонда (крива 1–0, крива 2–2, крива 3–4, крива 4–6). Концентрація олігонуклеотидного зонда В6 –  $0,25 \times 10^{-6}$  М. Спектри записано в 50 мМ трис-НСІ (рН 8,5),  $2,5 \times 10^{-2}$  мМ  $MgCl_2$ , 0,15 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,20 мМ КСІ за температури 25 °С. Вертикальна лінія вказує на відсутність батохромного та гіпсохромного зсуву при збільшенні концентрації олігонуклеотида В6b



**Рис. 2.** Спектри флуоресценції вільного **лінійного зонда В5** (крива 1) та його комплексів з комплементарним олігонуклеотидом В6b за різних співвідношень молярної концентрації мішені-олігонуклеотида до такої лінійного зонда (крива 1–0, крива 2–1, крива 3–2, крива 4–3). Концентрація олігонуклеотидного зонда В5 –  $0,5 \times 10^{-6}$  М. Спектри записано в 50 мМ трис-НСІ (рН 8,5),  $2,5 \times 10^{-2}$  мМ  $MgCl_2$ , 0,15 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,20 мМ КСІ за температури 25 °С. Вертикальна лінія вказує на відсутність батохромного та гіпсохромного зсуву при збільшенні концентрації олігонуклеотида В6b

Для визначення ефективності переносу енергії  $(1 - I_{DA}/I_D)$  було виміряно інтенсивності флуоресценції олігонуклеотидних зондів В5 та В6, які містять флуорофор FAM та гасник флуоресценції RTQ1 ( $I_{DA}$ ), а також інтенсивності флуоресценції олігонуклеотидів В5а та В6а ( $I_D$ ), які містять тільки FAM.

Теоретичний розрахунок радіусу  $R_0$ , відстані, на якій перенос енергії є найбільш ефектив-

ним для пар флуоресцентних барвників і гасників флуоресценції FAM – ВНQ1 та FAM – RTQ1, проведено відповідно до теорії Ферстера. Теорію дальнодіючого резонансного переносу енергії Ферстера, яку розроблено для міжмолекулярної взаємодії, було розвинено та розширено Декстером, який додав до теорії Ферстера полімолекулярну взаємодію (Dexter, 1953).

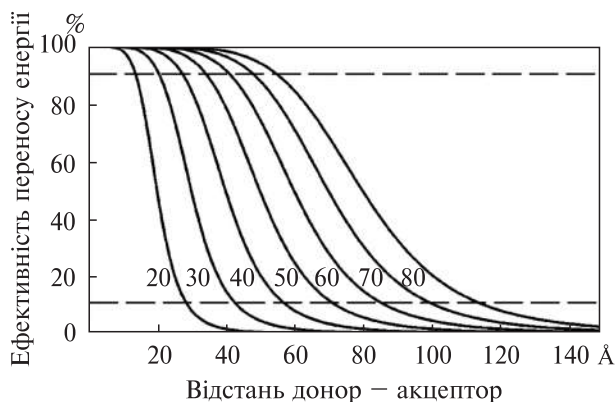
Теоретичні розрахунки Декстера з урахуванням обмінних взаємодій, що мають місце тільки на малих відстанях до 15–18 Å, було доповнено та експериментально підтверджено в роботі (Inokuti et al, 1965), авторами якої виявлено залежність між квантовим виходом та часом люмінесценції донора як функцію кількості акцептора.

Розрахований з наших експериментальних даних радіус міграції енергії  $R$  для шпилькового зонда становив 32,4 Å, а для лінійного зонда – 47,3 Å. При цьому для пари флуорофор – гасник FAM – RTQ1 значення радіусу міграції Ферстера  $R_0$  (відстань, на якій константа швидкості переносу енергії дорівнює константі швидкості загасання флуоресценції донора за відсутності акцептора), яке розраховано з рівняння 3, становило 61,9 та 63,9 Å в 50 мМ трис-НСІ (рН 8,5) буфері для шпилькового та лінійного зондів, відповідно. Отримані значення збігаються з діапазоном радіусу переносу енергії для систем флуорофор – гасник флуоресценції в залежності від відстані між донором та акцептором, яка визначає ефективність переносу енергії (Karapidis, 2002) (рис. 3).

Розраховані значення ефективності гасіння флуоресценції та радіусу міграції енергії для лінійного та шпилькового зондів наведено в таблиці.

Флуоресцеїн є найпопулярнішим барвником для ДНК-зондів. Абревіатуру FAM утворено від флуоресцеїнаміда, який приєднано у формі карбоксилпохідного до аміногрупи лінкера.

Ефективність гасіння для флуорофора FAM було виміряно за двох значень рН – за рН 6,5 (50 мМ какодилат Na) та рН 8,5 (50 мМ трис-НСІ). За рН 8,5 (умови для проведення ПЛР) FAM перебуває у вигляді діаніону, а за рН 6,5 –



**Рис. 3.** Залежність динамічного діапазону Ферстеровського резонансного переносу енергії (ФРПЕ) для різних значень радіусу Ферстера  $R_0$  від відстані між донором та акцептором. Пунктирними лініями обмежено область максимальної чутливості до відстані для пари донор-акцептор при різних значеннях  $R_0$ , яке, як правило, змінюється в межах від  $0,7R_0$  до  $1,5R_0$ . Публікується з люб'язного дозволу проф. Karapidis A. та проф. Weiss S.

як суміш діаніону та аніону, оскільки константа іонізації  $pK_3$  становить 6,6 (Lakowicz, 1986).

Гасник флуоресценції RTQ1 ( $\lambda_{\text{макс}} = 520$  нм) є непатентованим спектральним аналогом ВНQ1 (Black Hole Quencher 1), має високу площу перекривання свого спектра поглинання та спектра флуоресценції флуорофора FAM (результати не показано). Для розрахунку було використано параметри ВНQ1, характеристики якого є відомими, оскільки структура гасника RTQ1 зберігається в режимі комерційної таємниці.

Беручи до уваги, що рівновага при гібридації ДНК-мішені з зондом у форматі молекулярного маяка (тобто з шпильковим зондом) за кімнатної температури настає через 10 хв

**Ефективність гасіння флуоресценції (E), радіус Ферстера ( $R_0$ ) та радіус міграції енергії (R) для лінійного (B5) та шпилькового (B6) зондів для Ферстеровського та контактного механізмів передачі енергії (для шпилькового зонда B6)**

Буфер	$R_0$ , Å	E, %	R, Å	$R_0$ , Å	E, %	R, Å
	Лінійний зонд B5			Шпильковий зонд B6		
50 мМ трис-НСІ, Н 8,5	63,9	85,8	47,3	61,9	98,0	32,4
50 мМ какодилат Na, рН 6,5	42,6	83,5	32,5	40,9	70,2	35,5

(Krasnoperov, 2010), сигнал флуоресценції реєстрували через 30 хв. Через значне зменшення швидкості гібридизації за низької концентрації мішені можна очікувати, що чутливість детекції зросте при збільшенні тривалості інкубації.

Резонансний перенос енергії за механізмом Ферстера виникає в тому випадку, якщо донор та акцептор знаходяться на відстані від 10 до 100 Å один від іншого. Цей діапазон відповідає фрагменту двониткової ДНК довжиною приблизно від 3 до 30 п.н. та фрагменту одониткової ДНК довжиною від 4 до 43 нуклеотидів. При цьому ефективність переносу енергії визначають як кількість квантів, що перенесено від донора до акцептора, яку поділено на кількість квантів, що поглинено донором (Demchenko, 2009).

Крім дальнодіючого індукційного Ферстеровського механізму, на малих відстанях до 15–18 Å діє обмінний резонансний механізм переносу енергії – механізм Декстера, – який є можливим тільки при достатньо близькому розташуванні флуорофора та гасника, при якому їхні орбіталі перекриваються (Dexter, 1953). Гасіння за механізмом Декстера визначається експоненціальною залежністю від відстані, і оскільки обидва ці механізми є однонаправленими, в багатьох роботах вони не розрізняються (Hunyadi, 2006; Demchenko, 2009). В основі обох зазначених механізмів лежить динамічне гасіння, при якому флуорофор та гасник зберігають свої внутрішні властивості.

В залежності від рН середовища FAM може знаходитися у вигляді катіона, нейтральної форми, аніона або діаніона. При цьому катіон та нейтральна форма не флуоресціюють, а аніон та діаніон флуоресціюють (Sjoback et al, 1995).

Діаніон характеризується найбільшою інтенсивністю та квантовим виходом 0,93. Аніон також має значну флуоресценцію з квантовим виходом 0,37. Нейтральна та катіонна форми при збудженні переходять в аніон і флуоресціюють з квантовим виходом 0,30 та 0,18 відповідно.

Константи іонізації  $pK$  для катіона, нейтральної форми, аніона та діаніона становлять  $pK_1 = 2,08$ ,  $pK_2 = 4,31$  та  $pK_3 = 6,43$  відповідно (Sjoback et al, 1995).

Значення  $R_0$  для пари флуорофора FAM та гасника ВНQ1, яке розраховано відповідно до

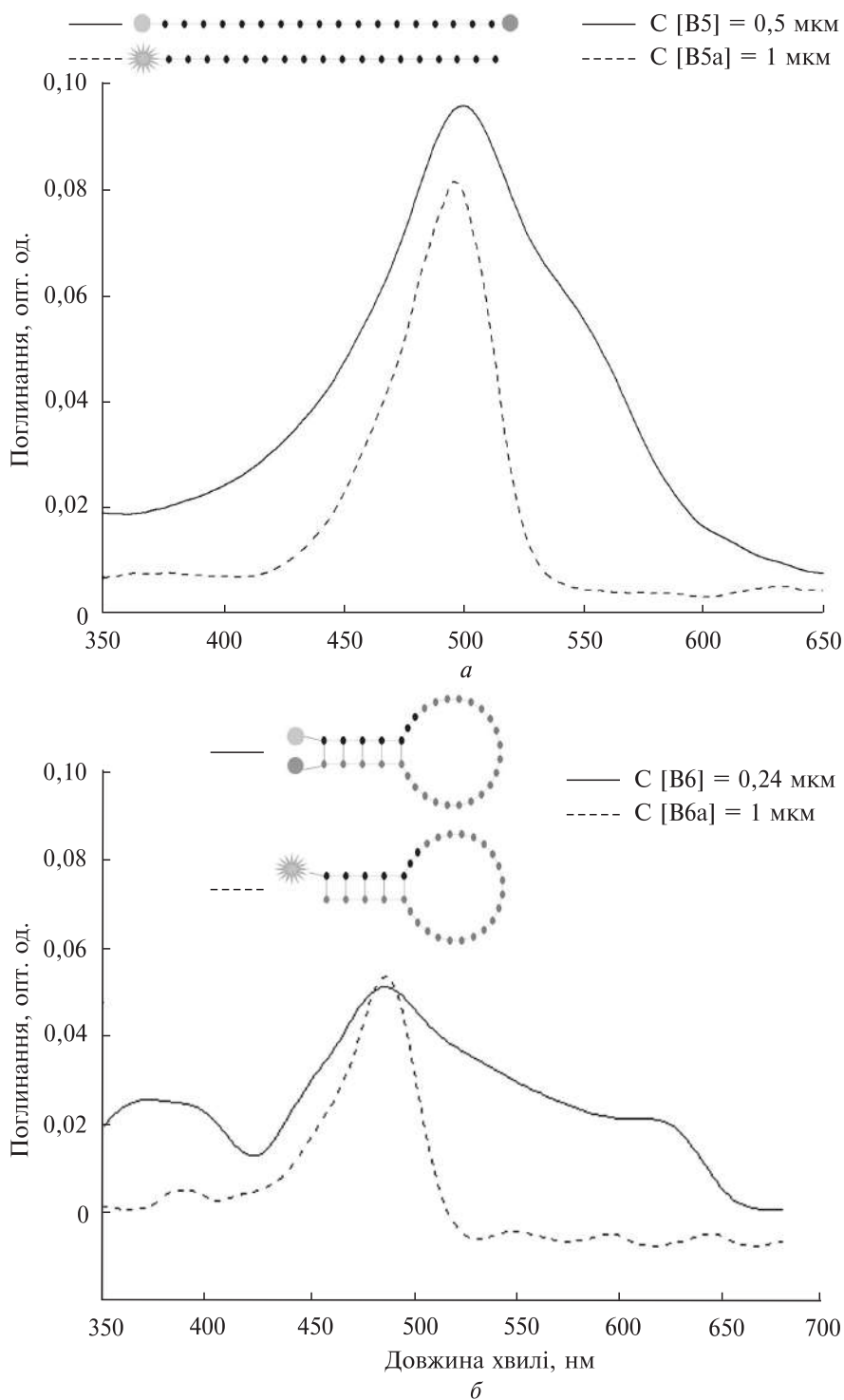
робіт (Forster, 1948; Lakowicz, 1986), становить 55 Å, що відповідає одонитковому олігонуклеотиду довжиною 24 нуклеотиди, а для пари FAM – RTQ1 зазначена величина дорівнює 50 Å, що відповідає довжині ланцюга в 21 нуклеотид.

Характерною особливістю флуоресцентних гібридизаційних зондів, в яких використовується динамічний (Ферстеровський) механізм переносу енергії (до яких віднесено, в тому числі, лінійні зонди у форматі TaqMan), є незмінність спектра поглинання при утворенні комплексу, оскільки динамічне гасіння впливає тільки на збуджений стан флуорофора (Lakowicz, 1986). Для зондів з контактним (статичним) механізмом переносу енергії (шпилькові зонди, скорпіонові зонди-праймери) показано, що спектри поглинання при внутрішньомолекулярній гібридизації змінюються (Magras, 2008).

Спектр поглинання для лінійного зонда (B5) практично збігається зі спектром олігонуклеотида B5a, що представляє зонд B5 без гасника RTQ1 (рис. 4, а). В той же час спектри поглинання для шпилькового зонда (B6) та олігонуклеотида B6a (що представляє зонд B6 без гасника RTQ1) значно відрізняються, що вказує на контактний механізм переносу енергії між флуорофором та гасником флуоресценції (рис. 4, б).

Максимум поглинання гасника RTQ1 відповідає  $\lambda = 520$  нм (дані не показано), а максимум флуоресценції флуорофора FAM зареєстровано при  $\lambda = 525$  нм (рис. 2, крива 1). Велика площа перекриття спектрів флуоресценції донора (FAM) та акцептора (RTQ1) веде до високої ефективності переносу енергії для пари FAM-RTQ1.

З спектрів флуоресценції зондів, записаних в 50 мМ какодилатному буфері (рН 6,5), в умовах, за яких в рівновазі знаходяться флуоресцентні аніонна та діаніонна форми FAM ( $pK_3 = 6,43$ ), параметри гасіння флуоресценції обох зондів також визначено (таблиця). Зокрема, визначено, що за таких умов ефективність гасіння флуоресценції (E) для лінійного зонда (83,5 %) перевищує таку для шпилькового зонда (70,2 %). Та обставина, що FAM може перебувати у водному розчині в діаніонній, аніонній, нейтральній, катіонній формах, робить його спектральні (в тому числі, флуоресцент-



**Рис. 4.** Спектри поглинання (а) лінійного зонда В5 (безперервна лінія) та олігонуклеотида В5а, що представляє олігонуклеотид В5 без гасника RTQ1 (пунктирна лінія), та (б) шпилькового зонда В6 (безперервна лінія) і олігонуклеотида В6а, що представляє олігонуклеотид В6 без гасника RTQ1 (пунктирна лінія), в 50 мМ трис-НСl (рН 8,5)



ні) властивості залежними від рН. Зменшення ефективності гасіння флуоресценції для шпилькового зонда за рН 6,5 можна пояснити зміною конформації GC-багатого стебла шпильки внаслідок часткового плавлення цього олігонуклеотидного дуплексу при зниженні рН від 8,5 до 6,5 за низької іонної сили, беручи до уваги, що інтервал плавлення коротких дуплексів становить 15–20 °С.

В роботі (Zimmers et al, 2019) показано, що в залежності від флуорофора та схеми гасіння відбувається збільшення температури відпалу для пари комплементарних олігонуклеотидів, які містять флуорофор та гасник на різній відстані один від одного, від 0,5 до 8,5 °С порівняно з неміченими олігонуклеотидами. Визначено, що для двониткового олігонуклеотида з флуорофором FAM на 5'-кінці сенсової нитки та гасником BHQ2 на 3'-кінці антисенсової нитки (на такій же відстані перебувають флуорофор та гасник для шпилькового зонда) температура відпалу збільшується на 8,5 °С. Найменший зсув температури відпалу (0,5 °С) зареєстровано для олігонуклеотидів з флуорофором FAM на 5'-кінці сенсової нитки та гасником BHQ2 на 3'-кінці антисенсової нитки, який перебуває на відстані 10 нуклеотидів від FAM (на 29-ти нуклеотидній відстані перебувають флуорофор та гасник для лінійного зонда).

З наведеного вище випливає, що модифікація флуорофором та гасником шпилькового та лінійного зондів по-різному впливає на їхню температуру відпалу. При виборі флуоресцентної схеми гасіння важливо брати до уваги, що для підвищення специфічності та роздільної (дискримінуючої) здатності ПЛР-РЧ з шпильковим зондом необхідно збільшувати температуру відпалу порівняно з розрахованою температурою відпалу для немодифікованих олігонуклеотидів приблизно на 8,5 °С.

Порівняння значень ефективності гасіння флуоресценції донора для шпилькового та лінійного зондів в умовах проведення ПЛР-РЧ (рН 8,5) підтверджує більше співвідношення сигнал/шум, а, отже, більш високий рівень гасіння флуоресценції для шпилькового зонда порівняно з лінійним при проведенні ПЛР-РЧ.

*Автори висловлюють подяку за допомогу в частині проведення спектральних досліджень*

*Муртазаєвій Л.О. та д.ф.-м.н., професору ХНУ ім. В.Н. Каразіна Горбенко Г.П.*

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Роботу виконано за фінансової підтримки д.б.н. О.Ю. Лиманської та д.б.н. О.П. Лиманського без зовнішнього фінансування.

#### INTRAMOLECULAR INTERACTIONS FOR FLUOROPHORE – QUENCHER IN LINEAR AND HAIRPIN PROBES FOR REAL-TIME PCR

*O.Yu. Limanskaya, A.P. Limanskii*

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 83 Pushkinskaya St., Kharkov, 61023 Ukraine  
Institute of Physiological Active Compounds, 58 Nauka Ave., Kharkov, 61072, Ukraine  
E-mail: olgaliman@ukr.net.

Experimental comparison of fluorescent quenching efficacy for two oligonucleotide probes in different conformations such as molecular beacon probe and TaqMan linear probe was performed. Interaction of quencher with fluorophore is different because these probes have different conformations. For linear probe quenching arises by inductive Forster resonance energy transfer (FRET) mechanism. For hairpin probe quenching occurs through contact quenching by more close location of fluorophore and quencher but Forster resonance energy transfer may occur too. Absorbance spectrum of linear probe practically coincides with spectrum oligonucleotide which represent probe without quencher that indicates onto dynamical (Forster) resonance energy transfer mechanism. Contrary, absorbance spectra of hairpin probe and oligonucleotide which represent probe without quencher are significantly different that points to contact energy transfer mechanism between fluorophore and quencher. Fluorescence spectra of probes and their complexes with complementary to linear probe oligonucleotide (and to loop of hairpin probe) and with amplicon (with length of 200 bp and which contains DNA target for probes) allow to compare these two probes by comparing radius of energy migration, fluorescent quenching efficacy. Radius of energy migration (R) calculated from experimental data for hairpin probe was 32,4 Å and for linear probe was 47,3 Å. Hairpin probe in comparison with linear

one is characterized by higher efficacy of fluorescent quenching that results in lower fluorescence background and therefore higher level of signal/noise during RT-PCR.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Demchenko AP (2009) Introduction in fluorescence sensing 1st edn., Springer Science and Business Media, Berlin.
- Dexter DL (1953) A theory of sensitized luminescence in solids. *J Chem Phys* 21:836–850. <https://doi.org/10.1063/1.1699044>.
- Forster T (1948) Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik (Leipzig)* 2:55. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>.
- Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Hezka J et al (2009) Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates. *J Microbiol Methods* 78:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.04.005>.
- Howell WM, Jobs IM, Brookes AJ (2002) iFRET: An improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome Res* 12:1401–1407. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.297202>.
- Hunyadi S, Murphy C (2006) Tunable one-dimensional silver-silica nanopeapod architectures. *J Phys Chem B* 110:7226–7231. <https://doi.org/10.1021/jp0603076>.
- Inokuti M, Hirayama F (1965) Influence of energy transfer by the exchange mechanism on donor luminescence. *J Chem Phys* 43:1978. <https://doi.org/10.1063/1.1697063>.
- Josefsen MH, Lofstrom C, Sommer HM et al (2009) Diagnostic PCR: Comparative sensitivity of four probe chemistries. *Mol Cell Probes* 23: 201–203. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.03>.
- Kapanidis A, Weiss S (2002) Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single molecule fluorescence analysis of biomolecules. *J Chem Phys* 117: 10953–10964. <https://doi.org/10.1063/1.1521158>.
- Krasnoperov LN, Marras SA, Kozlov M et al (2010) Luminescent probes for ultrasensitive detection of nucleic acids. *Bioconjug Chem* 21:319–327. <https://doi.org/10.1021/bc900403n>.
- Lakowicz JR (1986) Principles of fluorescence spectroscopy 1st edn., Plenum Press journal, New York.
- Latorra D, Arar K, Hurley JM (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes* 17:253–259. [https://doi.org/10.1016/s0890-8508\(03\)00062-8](https://doi.org/10.1016/s0890-8508(03)00062-8).
- Le Reste L, Hohlbein J, Gryte K et al (2012) Characterization of dark quencher chromophores as non-fluorescent acceptors for single-molecule FRET. *Biophys J* 102:2658–2668. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.028>.
- Limanskaya OYu, Murtazaeva LO, Limanskii AP (2012) Species specific detection of causative agent of anthrax. *Biotechnology* 5(1):92–99.
- Ma C, Liu H, Wu K et al (2017) An exonuclease I-based quencher-free fluorescent method using DNA hairpin probes for rapid detection of microRNA. *Sensors* 17:760. <https://doi.org/10.3390/s17040760>.
- Marras S, Kramer F, Tyagi S (2002) Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 30:e122. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf121>.
- Marras SA, Kramer FR, Tyagi S (2003) Genotyping SNPs with molecular beacons. *Methods Mol Biol* 212:111–128. <https://doi.org/10.1385/1-59259-327-5:111>.
- Marras S (2008) Interactive fluorophore and quencher pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Mol Biotechnol* 38:247–255. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9012-9>.
- Miura M, Tanigawa C, Fujii Y et al (2013) Comparison of six commercially-available DNA polymerases for direct PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55: 401–406. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000600005>.
- Munoz C, Talquenca SG, Volpe ML (2009) Tetra primer ARMS-PCR for identification of SNP in beta-tubulin of *Botrytis cinerea*, responsible of resistance to benzimidazole. *J Microbiol Methods* 78:245–246. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.06.007>.
- Parsons BL, McKinzie PB, Heflich RH (2005) Allele-specific competitive blocker-PCR detection of rare base substitution. *Methods Mol Biol* 291:235–245. <https://doi.org/10.1385/1-59259-840-4:235>.
- Sjoberg R, Nygren J, Kubista M (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A* 51:L7–L21.
- Takayama I, Nakauchia M, Takahashia H et al (2019) Development of real-time fluorescent reverse trans-cription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Virol Methods* 267:53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.02.010>.
- Tyagi S, Kramer FR (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14:303–308. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>.
- Vester B, Wengel J (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 43:13233–13241. <https://doi.org/10.1021/bi0485732>.
- Wang R-H, Liu L-M, Zhao J-L et al (2008) A new

- method for SNP typing based on allele specific PCR. *Fa Yi Xue Za Zhi* 24:189–193.
- Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB (1989) Allele-specific enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2757–2760. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2757>.
- Yaku H, Yukimasa T, Nakano S et al (2008) Design of allele-specific primers and detection of the human ABO genotyping to avoid the pseudopositive problems. *Electrophoresis* 29:4130–4140. <https://doi.org/10.1002/elps.200800097>.
- Zimmers ZA, Adam NM, Gabella WE et al (2019) Fluorophore-quencher interactions effect on hybridization characteristics of complementary oligonucleotides. *Anal Methods* 11:2862–2867. <https://doi.org/10.1039/c9ay00584f>.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl Acids Res* 31:3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>.

Надійшла в редакцію 30.05.22

Після доопрацювання 08.11.22

Прийнята до друку 18.03.23