

Ю. В. Мартыненко-Макаев¹, В. А. Брылёв², В. В. Удодова¹

¹Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

ДУБЛЕР-КРАСИТЕЛИ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДНК-ЗОНДОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Аннотация: Современная молекулярная диагностика, основным методом которой является полимеразная цепная реакция (ПЦР), широко используется для выявления различных заболеваний и контроля за их протеканием. Наибольшую популярность в наше время получили флуоресцентно-меченные ДНК-зонды, обладающие высокой чувствительностью и простотой использования. Наиболее важной характеристикой флуоресцентно-меченных ДНК-зондов является интенсивность флуоресценции. Увеличение интенсивности флуоресценции позволяет повысить чувствительность проводимых исследований. Увеличение интенсивности флуоресценции возможно путем множественного введения флуорофоров на специальных жесткокаркасных линкерах. В данной работе в качестве жесткокаркасного линкера были использованы производные 3,5-диаминобензойной кислоты. Таким образом, в работе описан синтез реагентов-разветвителей на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, а также получение их производных, несущих по две молекулы карбоксифлуоресцеина, а также фосфорамидитную либо азидную функцию для введения метки в олигонуклеотиды при помощи автоматического твердофазного синтеза или [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения. Показано, что полученные при помощи реагентов ДНК-зонды обладают практически двухкратным увеличением интенсивности флуоресценции и улучшенными фотофизическими характеристиками.

Ключевые слова: реагенты-разветвители, флуоресценция, дублер, 3,5-диаминобензойная кислота, флуоресцеин, ПЦР, ПЦР-РВ, усиление флуоресценции

Для цитирования: Мартыненко-Макаев, Ю. В. Дублер-красители для усиления флуоресценции ДНК-зондов в молекулярной диагностике / Ю. В. Мартыненко-Макаев, В. А. Брылев, В. В. Удодова // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2017. – № 3. – С. 72–78.

Y. V. Martynenko-Makaev¹, V. A. Brylev², V. V. Udodava¹

¹Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

ENHANCING THE FLUORESCENCE OF DNA-PROBES FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS

Abstract: Modern molecular diagnostics with polymerase chain reaction (PCR) is widely used as a basic tool for detection of various diseases and control of their course. Today the fluorescently labeled DNA-probes have the greatest popularity due to their high sensitivity and ease of use. Fluorescence intensity is the most important characteristic of fluorescently labeled DNA-probes. Increase of fluorescence intensity will enhance the sensitivity of analysis. Fluorescence intensity can be increased by multiple introduction of fluorophores based on special rigid linkers. Therefore the derivatives of 3,5-diaminobenzoic acid were used. In this paper we report on the synthesis of linkers based on 3,5-diaminobenzoic acid and their application in synthesis of the reagents with two fluorescein fluorophores and phosphoramidite or azide function for introduction of label into oligonucleotides. It is shown that obtained DNA-probes have almost twofold increase of fluorescence intensity and improved photophysical characteristics.

Keywords: branching reagents, fluorescence, doubler, 3,5-diaminobenzoic acid, fluorescein, PCR, PCR-RT, fluorescence enhancement

For citation: Martynenko-Makaev Y. V., Brylev V. A., Udodava V. V. Enhancing the fluorescence of DNA-probes for molecular diagnostics. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 72–78 (In Russian).

Введение. Современная молекулярная диагностика, основным методом которой является полимеразная цепная реакция, широко используется для выявления различных заболеваний и контроля за их протеканием. Применение ДНК-диагностики стало возможным с появлением специальных молекул – зондов. Так, неотъемлемыми частями любого ДНК-зонда являются: фрагмент ДНК, комплементарный исследуемой молекуле нуклеиновой кислоты в каком-либо организме; метка, представляющая собой радиоактивную частицу, флуоресцентный или аффинный фрагмент.

Наибольшую популярность в наше время получили флуоресцентно-меченные ДНК-зонды, обладающие высокой чувствительностью и простотой использования. Однако до сих пор ведутся исследования и разработки по улучшению, как правило, фотофизических свойств. Так, многими исследователями были предприняты попытки снизить фоновую флуоресценцию для полимерной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени [1]. Данное исследование проводилось с целью повышения интенсивности флуоресценции ДНК-зондов за счет введения нескольких молекул флуоресцентных красителей в молекулу зонда.

Известно, что при наличии в одном зонде нескольких флуорофоров может происходить неблагоприятное «самотушение», т. е. значительное ослабление флуоресценции [2]. Однако данное явление наблюдается при условии, что флуорофоры находятся на гибких линкерах, обеспечивающих невыгодную ориентацию красителей. Процесс «самотушения» можно минимизировать или полностью исключить с помощью жестких линкеров, обеспечивающих определенное пространственное расположение нескольких красителей в одном зонде [3–5]. Поэтому для создания ДНК-зонда с улучшенными фотофизическими характеристиками было решено синтезировать жесткокаркасные реагенты-разветвители (дублеры) на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, содержащие в качестве флуоресцентных красителей 5-карбоксифлуоресцеин и 6-карбоксифлуоресцеин (рис. 1) и несущие фосфорамидитную либо азидную функцию для введения метки в олигонуклеотиды при помощи автоматического твердофазного синтеза или [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения соответственно.

Так, из динитробензойной кислоты в семь стадий был получен реагент **10** (рис. 2) для введения модификаций в олигонуклеотиды, который был испытан в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза [6] (рис. 3). Также из 3,5-диаминобензойной кислоты в две стадии был получен реагент **15** (рис. 4), содержащий азидную функцию, для введения модификации посредством [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

Последующий анализ фотофизических характеристик модифицированных олигонуклеотидов продемонстрировал эффективность использования жесткокаркасного дублера на основе 3,5-диаминобензойной кислоты. Интенсивность флуоресценции олигонуклеотида **11**, модифицированного дублером **10**, в 1,7 раза превысила интенсивность флуоресценции олигонуклеотида, модифицированного одной молекулой флуоресцеина [6].

Экспериментальная часть. Реагент **10**, содержащий амидофосфитную функцию, получали из 3,5-динитробензойной кислоты **3** в семь стадий (рис. 2). Сперва из кислоты **3** по описанной методике [7] получали хлорангидрид **4**, который затем конденсировали с 4-транс-аминоциклогексанолом. После защиты гидроксильной группы в соединение **6** вводили две молекулы 5-карбоксифлуоресцеина **1**, используя его пивалатзащищенный пентафторфениловый эфир. После снятия ТГП-защиты получали амидофосфит **10**, который испытывали в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза (рис. 3). Структура полученного соединения подтверждалась методом ЯМР-спектроскопии.

В качестве исходного соединения для синтеза дублера **15** использовали 3,5-диаминобензойную кислоту **12**, которую ацилировали активированным пентафторфениловым эфиром пивалатзащищенного 6-карбоксифлуоресцеина **2** (рис. 4). Далее в полученный реагент **13** вводили азидную группу путем конденсирования с 3-азидопропил-1-амином. В качестве конденсирующего

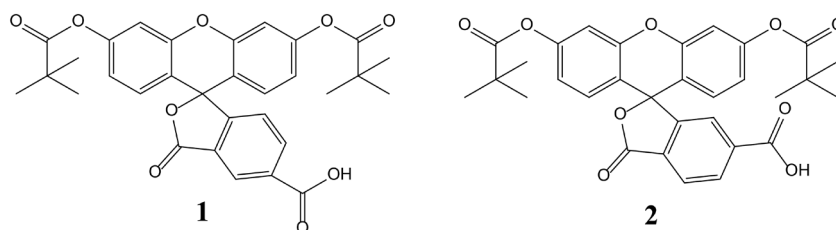


Рис. 1. 5-карбоксифлуоресцеин **1** и 6-карбоксифлуоресцеин **2**

Fig. 1. 5-carboxyfluorescein **1** and 6-carboxyfluorescein **2**

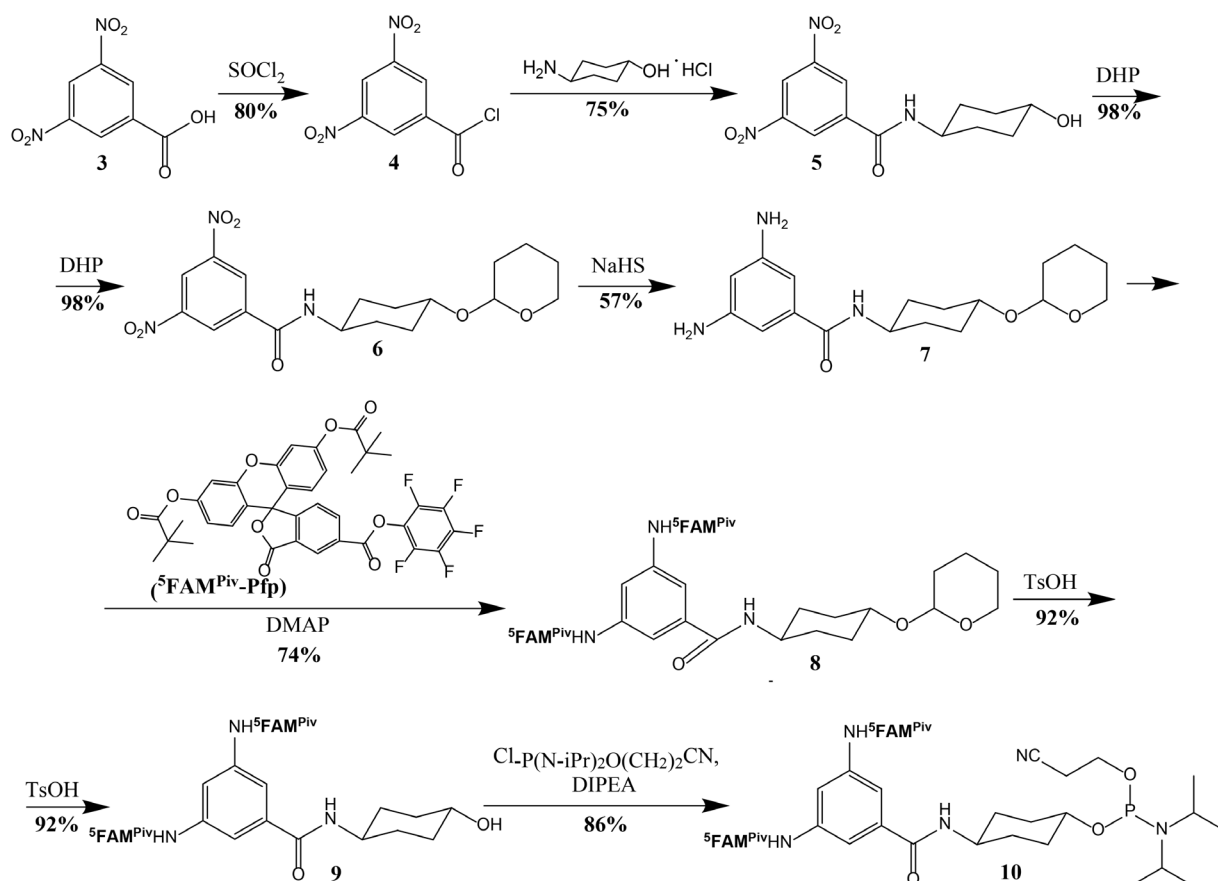


Рис. 2. Схема синтеза амидофосфита дублера **10**, содержащего две молекулы 5-карбоксифлуоресцеина
 Fig. 2. Synthesis scheme of amidophosphite of the doubler **10** containing two molecules of 5-carboxyfluorescein

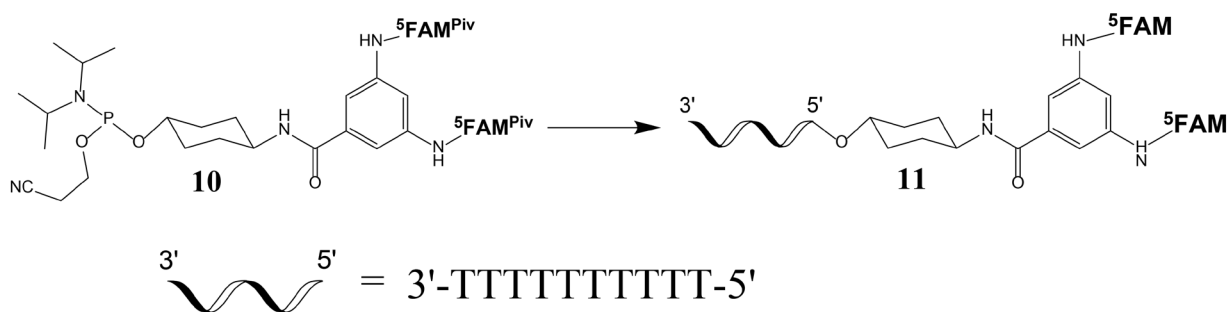
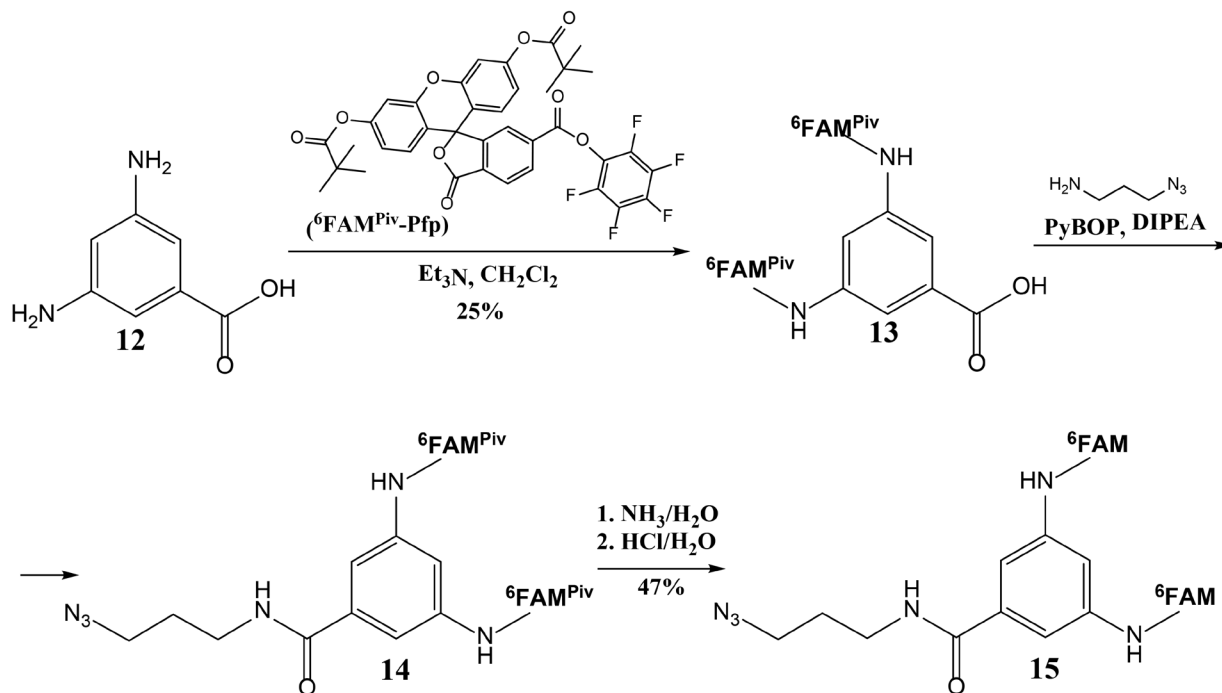


Рис. 3. Получение модифицированного олигонуклеотида **11**
 Fig. 3. Preparation of a modified oligonucleotide **11**

агента применяли РvБОР (бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат), широко использующийся в пептидном синтезе [8]. Структура полученного соединения подтверждалась методом ЯМР-спектроскопии. В ходе работы использовали ЯМР-спектрометр (Bruker 500 MHz), синтезатор ASM-800 (Biosset), гель-фильтрационная колонка NAP-10 (GE Healthcare).

Олигонуклеотидный синтез проводили в автоматическом режиме с использованием стандартных амидофосфитов dA^{Bz}, dC^{Bz}, dG^{Ibu}, T по протоколам изготовителя прибора. Конденсацию терминальных амидофосфитов ⁵FAM и ⁶FAM осуществляли в течение 5 мин (стадии кэпирования и удаления диметокситритильной группы не проводили). Отщепление олигонуклеотида от носителя и деблокирование осуществляли концентрированным 28%-ным раствором аммиака

Рис. 4. Синтез азидного производного жесткокаркасного дублера **15**, содержащего 2 молекулы 6-карбоксифлуоресцеинаFig. 4. Synthesis of azide derivative of the rigid doubler **15**, containing two molecules of 6-carboxyfluorescein

(0,75 мл). После деблокирования полученный раствор очищали при помощи электрофореза в 20%-ном денатурирующем (7 М мочевины) полиакриламидном геле (550 В, 20 мА, контроль по бромфеноловому синему и ксиленианолу). Олигонуклеотиды визуализировали в геле по поглощению красителя, элюировали 0,5 М LiClO₄ в течение 12 ч, отфильтровывали от геля и обессоливали на колонках NAP-10 (GE Healthcare). Полученные олигонуклеотиды дополнительно очищали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии в системе 0,1М ацетат аммония-ацетонитрил (100:0→20:80) на колонке с обращенной фазой Nucleosil (MACHEREY-NAGEL, C18, 4,6/250 мм, размер частиц 5 мк). Концентрацию олигонуклеотидов определяли фотометрически, измеряя поглощение при 260 нм.

Получение 3,5-динитробензоил хлорида (4). Смешивали 3,5-динитробензойную кислоту **3** (3,45 г, 16,27 ммоль) и 2 эквивалента тионилхлорида (2,4 мл, 32,54 ммоль). Затем добавляли 0,2 мл диметилформамида. Смесь нагревали до кипения, пока выделяется хлороводород и диоксид серы. После гомогенизации смесь дополнительно кипятили 20 мин и отгоняли избыток тионил хлорида в вакууме водоструйного насоса. Остаток перегоняли в вакууме 77 °С при 0,1 мм рт. ст. Получили 3,5-динитробензоил хлорид **4** (3 г, 80%).

Получение N-((1R,4R)-4-гидроксициклогексил)-3,5-динитробензамида (5). К смеси гидрохлорида *транс*-4-аминоциклогексанола (4 г, 26,3 ммоль) и 5 мл воды добавляли гидроксид натрия (1,05 г, 26,3 ммоль). Смесь перемешивали 10 мин, затем добавляли 10 мл тетрагидрофурана и раствор хлорангидрида 3,5-динитробензойной кислоты **4** (2,5 г, 10,85 ммоль) в 5 мл дихлорметана, при охлаждении до 0 °С. Смесь перемешивали 20 мин при комнатной температуре, затем снова добавляли гидроксид натрия (1,05 г, 26,3 ммоль) и раствор хлорангидрида 3,5-динитробензойной кислоты **4** (2,5 г, 10,85 ммоль) в 5 мл дихлорметана. Смесь перемешивали ночь при комнатной температуре, добавляли 50 мл дихлорметана и органический слой отделяли. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили смесь, которую хроматографировали в системе дихлорметан/метанол (20:1). Получили продукт **5** (5 г, 75%).

R_f 0,3 (метанол-дихлорметан 1:2 об./об.); ^1H ЯМР (DMSO-d_6): δ 9,04 (д, $J_{2,1} = 2,03\text{ Гц}$, 2H, H-2), 8,96 – 8,91 (м, 2H, H-1, OH), 4,63 (д, $J = 4,36\text{ Гц}$, 1H, OCNHCH-3), 3,85 – 3,70 (м, 1H, H-6), 1,92 – 1,81 (м, 4H, H-4e,5e), 1,49 – 1,33 (м, 2H, H-4a), 1,34 – 1,18 (м, 3H, H-3,5a); ^{13}C ЯМР 161,32, 148,14, 137,20, 127,52, 120,68, 68,26, 48,67, 34,08, 30,08.

Получение 3,5-динитро-N-((1R,4R)-4-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)циклогексил)бензамид (6). К раствору **5** (5,0 г, 16,18 ммоль) и дигидропирана (5 мл, 59,0 ммоль) в 20 мл дихлорметана и 10 мл тетрагидрофурана добавляли метансульфокислоту (0,25 мл, 3,87 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре 10 мин, затем кипятили 10 мин. После добавляли триэтиламин (0,5 мл, 3,6 ммоль) и растворитель упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 50 мл дихлорметана и промывали 10 мл насыщенного раствора гидрокарбоната натрия. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили смесь, которую хроматографировали в системе дихлорметан/тетрагидрофуран (5:1). Получили продукт **6** (6,2 г, 97,5%).

R_f 0,8 (метанол-дихлорметан 1:2 об./об.).

Получение 3,5-амино-N-((1R,4R)-4-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)циклогексил)бензамид (7). К кипящему раствору **6** (6,2 г, 15,78 ммоль) в смеси метанол/вода (50 мл/20 мл) по каплям в течение 30 мин добавляли свежеприготовленный раствор гидросульфида натрия (4,0 г, 71,43 ммоль) в 10 мл воды. По окончании прибавления смесь кипятили 20 мин, затем растворитель упаривали в вакууме и продукт экстрагировали дихлорметаном. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 4,5 г смеси, которую хроматографировали в системе дихлорметан/метанол/триэтиламин (40:1:1→10:1:1). Получили продукт **7** (3 г, 57%).

R_f 0,37 (метанол-дихлорметан 1:9 об./об.); ^1H ЯМР (DMSO-d_6): δ 7,75 (д, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H, OCNHCH-3), 6,18 (д, $J = 1,9\text{ Hz}$, 2H, H-2), 5,92 (т, $J = 1,9\text{ Hz}$, 1H, H-1), 4,85 (с, 4H, NH_2), 4,72 – 4,66 (м, 1H, OC(H)OCH_2), 3,81-3,75 (м, 1H, OC(H)OCHa или e), 3,71-3,61 (м, 1H, OCOSHa или e), 3,51-3,45 (м, 1H, H-6), 3,45-3,38 (м, 1H, H-3), 2,01 – 1,94 (м, 1H, OC(O)(H)CHa или e), 1,94-1,87 (м, 1H, OC(O)(H)CHa или e), 1,83 – 1,74 (м, 2H), 1,74 – 1,65 (м, 1H), 1,63 – 1,54 (м, 1H), 1,51 – 1,38 (м, 4H), 1,37 – 1,25 (м, 2H), 1,25 – 1,13 (м, 2H); ^{13}C (DMSO-d_6) ЯМР δ 167,31, 148,87, 136,75, 102,08, 96,06, 73,57, 61,62, 47,41, 45,49, 32,21, 30,18, 25,14, 19,43, 8,52.

Получение N,N-3,5-диамидо-бис(5-карбоксифлуоресцеин)-N-((1R,4R)-4-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)циклогексил)бензамида (8). К 0,2 mM раствору **7** (1,28 г, 3,84 ммоль) в дихлорметане добавляли 2,1 эквивалента ДМАП (0,98 г, 8,0 ммоль) и 2,1 эквивалента ДИПЭА (1,38 мл, 8,0 ммоль). Затем добавляли 2,2 эквивалента пивалатзащитного пентафторфенолового эфира 5-карбоксифлуоресцеина (5,47 г, 8,5 ммоль). Реакционную смесь нагревали до кипения в течение 24 ч, после чего промывали раствором 20 мл 1% HCl. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 5,85 г смеси, которую хроматографировали в системе дихлорметан/ацетон (10:0→8:2). Получили продукт **8** (3,93 г, 74 %) в виде светло-желтой смолы.

R_f 0,23 (ацетон-дихлорметан 1:9 об./об.); ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 9,52 – 9,22 (м, 1H, H-1 или OCNHCH-3), 8,61 – 8,44 (м, 2H), 8,37 – 8,26 (м, 1H, H-1 или OCNHCH-3), 8,27 – 8,13 (м, 2H), 7,91 – 7,65 (м, 2H), 7,24 – 7,13 (м, 2H), 7,00 – 6,92 (м, 4H, H-6'), 6,84 – 6,70 (м, 8H, H-4', H-5'), 4,72 – 4,61 (м, 1H), 3,94 – 3,78 (м, 2H), 3,60 – 3,51 (м, 1H), 3,50 – 3,39 (м, 1H), 2,10 – 1,90 (м, 2H), 1,85 – 1,74 (м, 1H), 1,71 – 1,61 (м, 1H), 1,58 – 1,44 (м, 4H), 1,34 (с, 36H, $\text{C(CH}_3)_3$), 1,29 – 1,18 (м, 6H).

Получение N-((1R,4R)-4-гидроксициклогексил)-N,N-3,5-диамидо-бис(5-карбоксифлуоресцеин)бензамида (9). К раствору **8** (3,78 г, 2,72 ммоль) в смеси дихлорметана с метанолом (10 мл/10 мл) добавляли 0,03 эквивалента п-толуолсульфокислоты (15,5 мг, 0,082 ммоль). Раствор кипятили в течение часа, затем отгоняли растворители и разбавляли сухой остаток 50 мл дихлорметана. Органическую фазу промывали 20 мл 2 M KHCO_3 и 20 мл насыщенного NaCl, пропускали через фильтр с безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 3,5 г смеси, которую хроматографировали в системе дихлорметан/ацетон (9:1→8:2). Получившееся вещество дополнительно перекристаллизовали из метанола и получили продукт **9** (3,26 г, 92%) в виде белых кристаллов.

R_f 0,26 (ацетон-дихлорметан 2:8 об./об.); ^1H NMR (CD_3CN) δ 9,54 – 9,27 (м, 1H, H-1 или OCNHCH-3), 8,58 – 8,43 (м, 2H), 8,43 – 8,29 (м, 1H, H-1 или OCNHCH-3), 8,29 – 8,12 (м, 2H), 7,89 –

7,69 (м, 2H), 7,32 – 7,17 (м, 2H), 7,09 – 6,95 (м, 4H, H-6'), 6,87 – 6,68 (м, 8H, H-4', H-5'), 3,77 – 3,66 (м, 1H), 3,47 – 3,35 (м, 1H), 2,84 – 2,73 (м, 1H), 1,91 – 1,75 (м, 4H), 1,30 (с, 36H, C(CH₃)₃), 1,24 – 1,11 (м, 4H).

Получение N,N-3,5-диамидо-бис(5-карбоксифлуоресцеин)-N-((1R,4R)-4-((цианэтилдиизопропилофосфорамидит)окси)циклогексил)бензамида (10). Раствор **9** (1,304 г, 1,0 ммоль) соупаривали с сухим дихлорметаном 2 раза в вакууме, растворяли в 15 мл дихлорметана, при перемешивании добавляли ДИПЭА (210 мкл, 1,2 ммоль) и по каплям 2-цианэтокси-N,N-диизопропиламинохлорофосфин (246 мкл, 1,1 ммоль). Через 1,5 ч смесь разбавляли до 100 мл дихлорметаном, промывали смесью насыщенных растворов хлорида и гидрокарбоната натрия (2 × 50 мл/50 мл). Сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и отгоняли растворитель в вакууме и получили вещество (2,1 г). Хроматографировали в системе дихлорметан/триэтиламин (99:1).

Получили вещество **10** (1,6 г). Данное вещество растворяли в 5 мл дихлорметана, и прикапывали к охлажденному до 0 °С петролейному эфиру (300 мл) при перемешивании. Выпал осадок, который отфильтровывали. Выход продукта **10** – 1,3 г, 86%.

R_f 0,46 (ацетон-триэтиламин-дихлорметан 1:1:9 об./об./об.); ¹H ЯМР (CD₃CN) δ 9,61 – 9,36 (м, 1H, H-1 или OCNHCH-3), 8,61 – 8,42 (м, 2H), 8,42 – 8,30 (м, 1H, H-1 или OCNHCH-3), 8,29 – 8,10 (м, 2H), 7,92 – 7,70 (м, 2H), 7,32 – 7,15 (м, 2H), 7,09 – 6,98 (м, 4H, H-6'), 6,87 – 6,66 (м, 8H, H-4', H-5'), 3,87 – 3,62 (м, 4H, H-3, H-6, OCH₂CH₂CN), 3,61 – 3,43 (м, 2H), 2,64 – 2,53 (м, 2H), 2,31 – 2,17 (м, 2H), 1,92 – 1,81 (м, 2H), 1,30 (с, 36H, C(CH₃)₃), 1,24 – 1,18 (м, 4H), 1,16 – 1,06 (м, 12H, CH(CH₃)₂).

Получение 3,5-бис(3-оксо-3',6'-бис(пивалоилокси)-3H-спиро[изобензофуран-1,9'-ксантен]-6-ил-карбоксиамидо)бензойная кислота (14). К 0,2 mM раствору 3,5-диаминобензойной кислоты **13** (500 мг, 3,3 ммоль) в N,N-диметилформамиде добавляли 2,1 эквивалент ДМАП (0,84 г, 6,9 ммоль) и 3,1 эквивалента ДИПЭА (1,75 мл, 10,2 ммоль). Затем добавляли 2,2 эквивалента пентафторфенилового эфира пивалатзащитного 6-карбоксифлуоресцеина (4,9 г, 6,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 12 ч, после чего ее вливали в 150 мл 1%-ного раствора HCl. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали дистиллированной водой 3×25 мл. Осадок растворяли в хлористом метиле и сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 6,65 г смеси, которую хроматографировали в системе толуол/ацетон (10:0→9:1). Получили продукт **14** (0,98 г, 25%) в стеклообразного твердого вещества.

R_f 0,75 (ацетон-толуол 2:8 об./об.); ¹H ЯМР (CD₃CN) δ 9,12 (м, 2H), 8,46 (м, 1H), 8,11 (м, 2H), 8,05 (д, J = 8,0 Hz, 2H), 7,69 (м, 2H), 7,03 (м, 2H), 6,81 (д, J = 7,7 Hz, 2H), 6,71 (д, J = 7,4 Hz, 2H), 1,31 (с, 36H).

Получение 3-азидопротил 3,5-бис(3',6'-дигидрокси-3-оксо-3H-спиро[изобензофуран-1,9'-ксантен]-6-илкарбоксиамидо)бензоат (15). К раствору соединения **14** (250 мг, 0,2 ммоль) в 10 мл дихлорметана добавляли 2 эквивалента ДИПЭА (70 мкл, 0,4 ммоль) и 1 эквивалент бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат (103,5 мг, 0,2 ммоль). При перемешивании смеси в течение 10 мин добавляли раствор 1 эквивалента аминопропил-3-азида (20 мкл, 0,2 ммоль) в 1 мл дихлорметана. Через час раствор разбавляли до 50 мл и промывали дистиллированной водой (2×20 мл), насыщенными растворами гидрокарбоната натрия (20 мл) и хлорида натрия (20 мл). Сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и отгоняли растворитель в вакууме и получили 290 мг смеси, которую хроматографировали в системе толуол/ацетон (10:0→9:1). Полученный продукт (126 мг) в стеклообразного твердого вещества. R_f 0,65 (ацетон-толуол 2:8 об./об.). Далее полученное соединение растворяли в 3 мл ацетона и к полученному раствору добавляли 1 мл 25%-ного водного раствора аммиака. После часа перемешивания из реакционной среды удаляли ацетон и избыток аммиака на ротаторном испарителе. Раствор разбавляли до 2 мл дистиллированной водой и добавляли 10%-ный раствор хлороводородной кислоты, выпавший кристаллический осадок отфильтровывали и промыли дистиллированной водой. Полученные кристаллы высушивали, получили 90 мг продукта **15** с выходом 47%.

R_f 0,8 (ацетон-толуол 3:2 об./об.); ¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,33 – 7,95 (м, 5H), 7,81 – 7,50 (м, 6H), 7,03 (м, 5H), 6,77 (м, 7H), 0,94 – 0,81 (м, 3H).

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. ПЦР «В реальном времени» / Д. В. Ребриков [и др.]. – М., БИНОМ, 2009.
2. Wilson, J. N. Efficient Quenching of Oligomeric Fluorophores on a DNA Backbone / J. N. Wilson, Y. N. Teo, E. T. Kool // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007, Vol. 129. – P. 15426–15427.
3. Synthesis of dye/fluorescent functionalized dendrons based on cyclotriphosphazene / A. Hameau [et al.] // *Beilstein journal of organic chemistry*. – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 1577–1583.
4. Labeling of antibodies with Cy3-, Cy3. 5-, Cy5-, and Cy5. 5-monofunctional dyes at defined dye/protein ratios / C. D. Hahn, C.K. Riener, H.J. Gruber // *Single Molecules*. – 2001. – Vol. 2, № 2. – P. 149–159.
5. Martin, V. V. Amplified fluorescent molecular probes based on 1, 3, 5, 7-tetrasubstituted adamantane / V. V. Martin, I. S. Alferiev, A. L. Weis // *Tetrahedron letters*. – 1999. – Vol. 40, № 2. – P. 223–226.
6. Misra, A. Synthesis and Fluorescence Studies of Multiple Labeled Oligonucleotides Containing Dansyl Fluorophore Covalently Attached at 2'-Terminus of Cytidine via Carbamate Linkage / A. Misra, S. Mishra, K. Misra // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – Vol. 15. – P. 638–646.
7. Титце, Л. Препаративная органическая химия. Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории / Л. Титце, Т. Айхер. – М.: Мир, 1999. – 704 с.
8. Novel Non-Nucleosidic Building Blocks for the Preparation of Multilabeled Oligonucleotides / A. Guzaev [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 1996. – Vol. 7. – P. 240–248.

References

1. Rebrikov D. V., Samatov G. A., Trofimov D. Iu., Semenov P. A., Savilova A. M., Kofiadi I. A., Abramov D. D., *PTsR v real'nom vremeni* [Real-time PCR], in Rebrikov D. V. (ed.), 2nd ed., BINOM. Laboratoriia znaniy, Moscow, RU, 2009.
2. Wilson J.N., Teo Y.N., Kool E.T., “Efficient Quenching of Oligomeric Fluorophores on a DNA Backbone”, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, vol. 129, pp. 15426–15427.
3. Hameau A., Fuchs S., Laurent R., Majoral J.-P., Caminade A.-M., “Synthesis of dye/fluorescent functionalized dendrons based on cyclotriphosphazene”, *Beilstein journal of organic chemistry*, 2011, vol. 7, no. 1, pp. 1577–1583.
4. Hahn C. D., Riener C. K., Gruber H. J., “Labeling of antibodies with Cy3-, Cy3. 5-, Cy5-, and Cy5. 5-monofunctional dyes at defined dye/protein ratios”, *Single Molecules*, 2001, vol. 2, no. 2, pp. 149–159.
5. Martin V. V., Alferiev I. S., Weis A. L., “Amplified fluorescent molecular probes based on 1, 3, 5, 7-tetrasubstituted adamantane”, *Tetrahedron letters*, 1999, vol. 40, no. 2, pp. 223–226.
6. Misra A., Mishra S., Misra K., “Synthesis and Fluorescence Studies of Multiple Labeled Oligonucleotides Containing Dansyl Fluorophore Covalently Attached at 2'-Terminus of Cytidine via Carbamate Linkage”, *Bioconjugate Chemistry*, 2004, vol. 15, pp. 638–646.
7. Tietze L., Eicher T., *Preparativnaia organicheskaiia khimiia. Reaktsii i sintezy v praktikume organicheskoi khimii i nauchno-issledovatel'skoi laboratorii* [Preparative organic chemistry. Reactions and syntheses in the workshop of organic chemistry and research laboratory], Mir, Moscow, RU, 1999.
8. Guzaev A., Salo H., Azhayev A., Lönnberg H., “Novel Non-Nucleosidic Building Blocks for the Preparation of Multilabeled Oligonucleotides”, *Bioconjugate Chemistry*, 1996, vol. 7, pp. 240–248.

Информация об авторах

Мартыненко-Макаев Юрий Владимирович – магистр хим. наук, мл. науч. сотрудник, аспирант, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yrmart@gmail.com.

Удодова Виктория Витальевна – магистрант, мл. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vika.udodova@tut.by.

Брылёв Владимир Анатольевич – аспирант, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской Академии наук (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997, Москва, Российская Федерация).

Information about the authors

Yury V. Martynenko-Makaev – M. Sc. (Chemistry), Junior researcher, Ph. D. student, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yrmart@gmail.com.

Viktoryia V. Udodava – Master student, Junior researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vika.udodova@tut.by.

Vladimir A. Brylev – Ph. D. student, M.M. Shemyakin and Yu.A. Oychinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (16/10, Miklukho-Maklaya, 117997, Moscow, Russian Federation).