

# Синтез 3'- та 3',5'-модифікованих олігонуклеотидів на функціоналізованому силікагелі «Силохром-2»

І. Я. Дубей, Л. В. Дубей, Д. М. Федоряк<sup>1</sup>

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

<sup>1</sup> Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України  
Вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна

dubey@imbg.org.ua

---

*Описано отримання 3'-моно- та 3',5'-біс-мічених олігонуклеотидів на новому полімерному носіїві з використанням мікросферичного силікагелю «Силохром-2», функціоналізованому флуоресцеїном. На цьому полімері твердофазним фосфітамідним методом синтезовано олігонуклеотид (dT)<sub>15</sub>, що містить залишок барвника на 3'-кінці. Постсинтетичною 5'-модифікацією 3'-кон'югати вдалося отримати олігомер, мічений двома молекулами флуоресцеїну. У майбутньому це буде використано для синтезу флуоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот.*

---

*Ключові слова:* олігонуклеотидні кон'югати, флуоресцентні мітки, твердофазний синтез, функціоналізація.

---

Вступ. Розвиток біотехнології та медицини спричинив значний інтерес до кон'югатів між олігонуклеотидами та іншими молекулами зі специфічними властивостями — репортерними, ліпофільними та транспортними групами, білками, хімічними нуклеазами тощо [1—7]. Хімічно модифіковані олігонуклеотиди широко використовують як ДНК/РНК-зонди, праймери для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), у секвенуванні нуклеїнових кислот (НК), при вивченні білково-нуклеїнової взаємодії та ін. [1, 6—9]. Нерадіоактивно мічені олігонуклеотиди з флуоресцентними, хемілюмінесцентними, афінними чи спіновими репортерними групами поступово стають основними реагентами для детекції НК. Надалі актуальними стають розробка нових методів ковалентного мічення олігонуклеотидів та підвищення чутливості детекції НК-мішеней.

Існують два основних варіанти отримання олігонуклеотидних кон'югатів [1—5]. Перший з них базується на синтезі та виділенні олігонуклеотидів, функціоналізованих реакційноздатними групами, найчастіше — аміно- чи меркаптоалкільними, з наступним приєднанням до них репортерних молекул. Другий підхід полягає у введенні репортерної групи безпосередньо в процесі твердофазного синтезу олігонуклеотидної послідовності. У цьому випадку ключовим фактором є стабільність приєднаної групи в умовах синтезу та деблокування олігонуклеотиду. Описано також полімерні носії, що містять репортерні групи, приєднані через спеціальні лінкери, на яких можна синтезувати олігонуклеотидну послідовність з утворенням 3'-мічених олігомерів. Деякі з цих носіїв комерційно доступні («Glen Research», «TriLink», «Synthegen», «Sigma-Genosys» та інші фірми).

Недавно нами отримано полімерний носій 1 на основі мікросферичного аеросилогелю «Силохром-

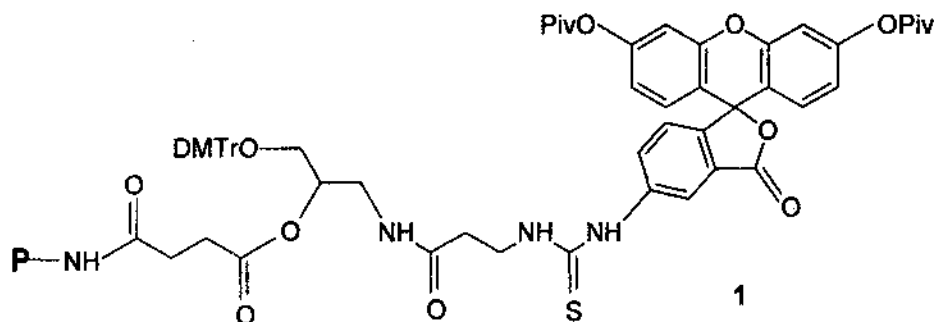


Рис. 1. Структура полімерного носія, використаного для синтезу мічених флуоресцеїном олігонуклеотидів: Silica — силікагель «Силохром-2»

2», модифікованого флуоресцеїном (рис. 1) [10]. Полімер дозволяє проводити твердофазний синтез флуоресцентно мічених фрагментів НК. У представленій роботі описано синтез моно- та біс-мічених олігонуклеотидів на цьому носії.

**Матеріали і методи.** Використано 1,1'-карбондіїмідазол (CDI) та флуоресцеїн-5-ізотіоціанат (FITC, isomer I) («Merck», Німеччина), захищений дезокситимідин-3'-фосфітамід та тетразол для олігонуклеотидного синтезу, трис(гідроксиметил)амінометан, акриламід та метилен-біс-акриламід для електрофорезу («Sigma», США). Інші реагенти та розчинники виробництва «Макрохім» (Україна). Ацетонітрил переганяли над  $\text{P}_2\text{O}_5$  та гібридом кальцію, діоксан — над  $\text{NaOH}$ . Синтез полімеру 1 здійснювали, як описано в [10]. Спектри поглинання записували на спектрофотометрі Shimadzu UV-3100 (Японія).

**Синтез кон'югатів олігонуклеотидів з флуоресцеїном.** Твердофазний синтез олігонуклеотиду  $(\text{dT})_{15}$  проводили на полімері 1 у масштабі 0,25 мкмоль стандартним фосфітамідним методом на синтезаторі Applied Biosystems Model 381A. На стадії приєднання першого нуклеотидного компонента тривалість реакції конденсації було збільшено до 5 хв. Після завершення синтезу послідовності та фінального 5'-детритилування полімерний носій ділили на дві частини, які далі використовували для отримання двох різних флуоресцеїнових кон'югатів.

Для одержання 3'-міченого олігомеру 2 після синтезу послідовності  $(\text{dT})_{15}$  полімер витримували в 1 мл конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (50 °С, 6 год). Деблокований продукт виділяли знесолюванням аміачного розчину на колонці PD-10 («Pharmacia», Швеція), використовуючи 0,05 М триетиламоній-бікарбонатний буфер (TEAB, pH 7,8) як елюент. Кон'югат 2

виділяли електрофорезом у 20 %-му поліакриламідному гелі. UV-Vis:  $A_{260}/A_{494} = 2,04$ .

Для синтезу олігомеру з двома кінцевими флуоресцентними групами після завершення нарощування послідовності  $(\text{dT})_{15}$  на 5'-кінець олігонуклеотиду, приєднаного до полімерного носія, вводили аміноалкільну групу карбондіїмідазолідним методом [11]. Детритильований полімер обробляли 1 мл 0,3 М розчину CDI у сухому діоксані протягом 45 хв, промивали діоксаном (5 × 1 мл), а далі витримували в 1 мл 0,2 М розчину гексаметилендіаміну в суміші діоксан: вода (9:1) протягом 45 хв. Полімер промивали діоксаном (3 × 1 мл), метанолом (3 × 1 мл) та ефіром (3 × 1 мл). Олігонуклеотид 3, що містить залишок флуоресцеїну на 3'-кінці та аліфатичну аміногрупу на 5'-кінці, відщеплювали від полімеру та деблокували за допомогою обробки носія концентрованим аміаком, знесолювали та виділяли гель-електрофорезом, як описано вище. Аміномодифікований олігомер 3 рухається в гелі повільніше, ніж нефункціонізований кон'югат 2. 5'-Аміноалкільований кон'югат 3 ( $A_{260}$ , ~21 нмоль) обробляли розчином FITC у суміші 0,1 М карбонат-бікарбонатного буфера (pH 9,5) та диметилформаміду (2:1) за модифікованим методом [12]. Розчин FITC у ДМФ (10 мг/мл, 75 екв. реагенту відносно олігонуклеотиду) додавали до розчину олігомеру 3 у водному буфері та витримували протягом ночі при кімнатній температурі. Продукт кон'югації відділяли від надлишку незв'язаного барвника за допомогою гель-фільтрації. Реакційну суміш розбавляли двома об'ємами води та наносили на колонку PD-10, врівноважену 0,05 М ТЕАВ-буфером (pH 7,8), що містить 5 %  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Елюцію проводили цим же буфером. Подвійно мічений кон'югат 4 очищували гель-електрофорезом. Олігомер з двома репортерними групами

рухається в гелі повільніше, ніж аналог з однією міткою. Вихід кон'югату 4 становив 1,4  $A_{260}$  (~8,5 нмоль, 40 %). UV-Vis:  $A_{260}/A_{494} = 1,18$ .

**Результати і обговорення.** У літературі описано ряд носіїв для олігонуклеотидного синтезу, модифікованих флуоресцентними барвниками, серед яких флуоресцеїн, родамін та ін. [13—17]. Для отримання полімерних носіїв для синтезу 3'-мічених олігонуклеотидів потрібен біфункціональний лінкер, що дозволяє одночасно приєднувати як репортерну групу, так і олігонуклеотид. Структури лінкерів, як правило, базуються на синтонах типу 2-заміщеного 1,3-пропандіолу. Для синтезу лінкера ми використали подібну структуру 3-амінопропан-1,2-діолу. Лінкер вводили в раніше описаний нами вискоєфективний носій на основі мікросферичного силікагелю «Силохром-2», що містить спейсер амінопропіл-сукцинат-етилендіамін [18]. В результаті було отримано флуоресцеїн-модифікований полімер 1 (рис. 1) [10]. Носій містить залишок флуоресцеїну, захищений двома півалоїльними групами для уникнення побічних реакцій по фенольному гідроксилу барвника [13, 19, 20]. Діацильований лактон флуоресцеїну легко деблокується при амонолізі з утворенням нормальної кіноїдної структури барвника.

На полімері 1 синтезували модельний пентадекатимідилат  $(dT)_{15}$  традиційним фосфітамідним методом. Першу реакцію конденсації проводили протягом довшого часу, ніж на подальших стадіях синтезу (5 хв замість 2 хв). Подовження часу приєднання першого нуклеотиду рекомендують при синтезі на модифікованих полімерах, до яких приєднані великі репортерні молекули. Це компенсує наявний у даному випадку негативний вплив стеричного фактора. Вихід першої реакції конденсації становив 96 %, а виходи подальших конденсацій перевищували 98 %.

Для отримання 3'-флуоресцеїнової похідної 2 олігонуклеотид після завершення побудови нуклеотидної послідовності відщеплювали від полімеру та деблокували амонолізом і далі кон'югат 2 очищували електрофорезом у поліакриламідному гелі (схема). Флуоресцеїн-вмісні олігонуклеотиди легко детектуються в гелі за своєю зелено-жовтою флуоресценцією при опроміненні гелю довгохвильовим УФ-світлом (365 нм). Олігомери, які містять барвник, менш рухливі в гелі порівняно з немодифікованими.

У реакційній суміші, утвореній при синтезі

$(dT)_{15}$  на полімері 1, містилася помітна кількість нефлуоресцентних олігомерів. Ймовірно, це пов'язано з тим, що під час синтезу самого полімеру 1 приєднання барвника до O-DMTr-захищеного амінолінкера було не кількісним (вміст DMTr-групи та флуоресцеїну в полімері становив відповідно 38 та 28 мкмоль/г [10]), тому частина олігонуклеотидних ланцюгів синтезується на лінкері, який не містить барвника. Однак електрофоретичне відділення флуоресцеїн-модифікованих олігомерів від немічених послідовностей цілком ефективно внаслідок різної рухливості мічених і немічених продуктів. Введення аміноалкільної групи на 5'-кінець додатково знижує рухливість олігомерів.

Можливим є приєднання другої репортерної групи до 5'-кінця 3'-кон'югатів [13—15, 21—23]. Описано численні приклади подвійно мічених олігонуклеотидів. Так, олігомери, мічені двома барвниками, використовують ефект резонансного переносу енергії флуоресценції (FRET) між хромофором-донором та акцептором для гомогенної детекції НК, аналізу фрагментів ПЛР та ін. [8, 24—30]. Елегантна технологія детекції гібридизації НК у розчині використовує так звані «молекулярні бекони» (molecular beacons) — олігонуклеотиди, здатні формувати шпилькові структури, модифіковані просторово зближеними кінцевими флуорофором та групою, що гасить флуоресценцію. При гібридизації такого зонда з комплементарною НК барвники розходяться, що веде до зростання флуоресценції [31]. Є й інші технології детекції НК, які базуються на подібних принципах (Scorpions, Sunrise primers, LUX primers тощо). Відповідні мічені олігонуклеотиди мають загальну назву light-up probes, тобто зонди, що «розгоряються» при зв'язуванні з НК-мішенями [28, 32]. Зараз доступним є синтез подвійно мічених олігонуклеотидів на замовлення, однак вони дуже дорогі (для синтезу в масштабі 0,2 мкмоль ціна становить \$ 300—600 залежно від типу міток).

Ввести другу репортерну групу можна безпосередньо в процесі твердофазного синтезу, використовуючи фосфітамідні чи Н-фосфонатні похідні міток, які потрібно приєднати [2—5]. Ми провели постсинтетичну модифікацію, приєднавши на першому етапі аміногексильну групу до 5'-кінця олігомеру 2 та виділивши функціоналізований олігонуклеотид 3, що містить барвник на 3'-кінці. 5'-Аміноалкільну групу вводили карбонілдіімідазольним методом, який полягає в обробці приєданого до

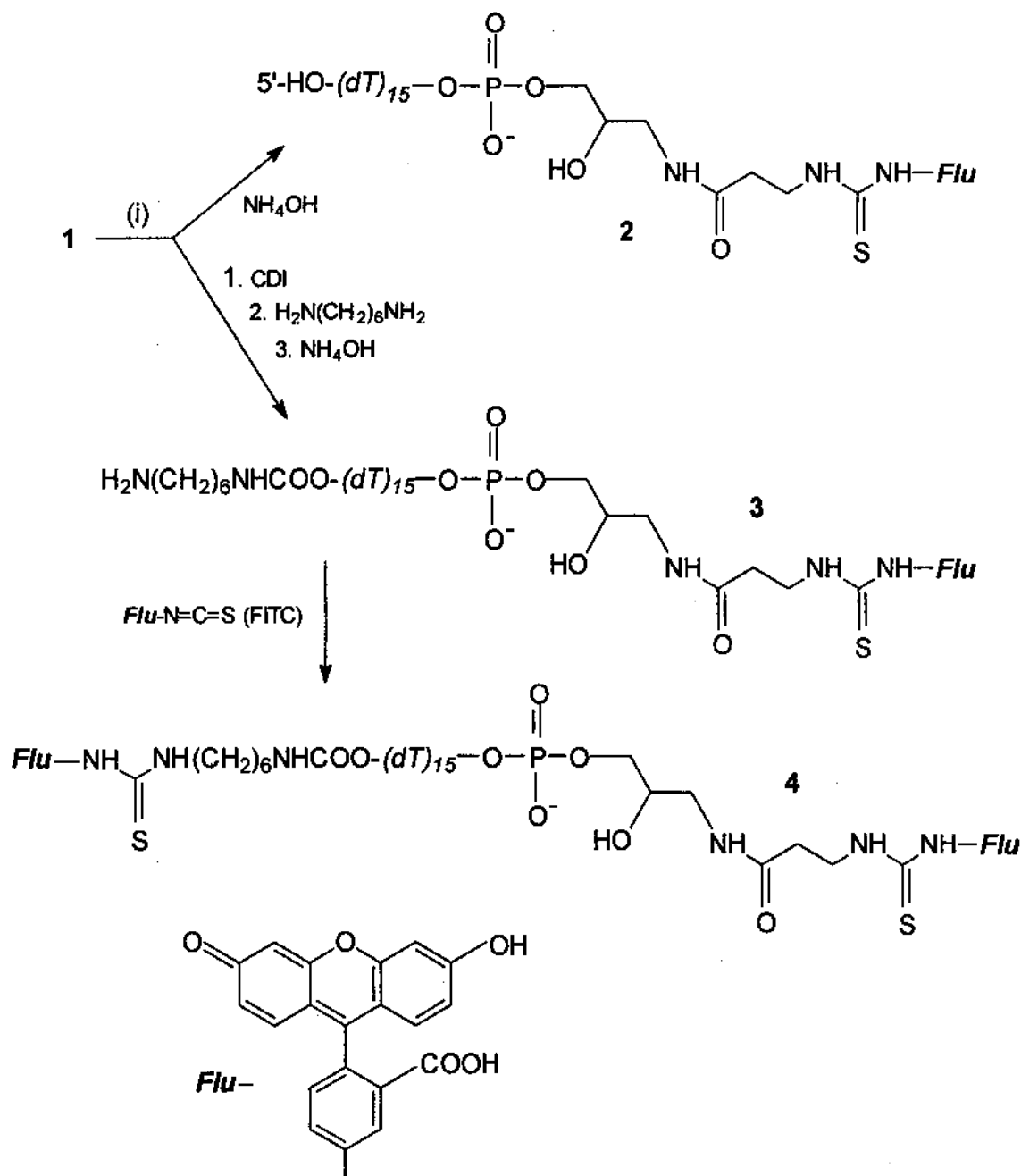


Схема синтезу моно- та біс-мічених олігонуклеотидів

полімеру захищеного олігонуклеотиду CDI, а потім гексаметилендіаміном [11]. Після деблокування олігомер 3 виділяли за допомогою гел-електрофору. Функціоналізований кон'югат 3 реагував з класичним FITC у водно-органічному середовищі при рН 9,5 [12]. Використовували 75-кратний надлишок барвника відносно олігонуклеотиду. За цих умов другий флуорофор приєднувався до оліго-

меру 3 майже кількісно, за даними вискоєфективної рідинної хроматографії, з утворенням подвійно міченого  $(dT)_{15}$ .

Таким чином синтезовано модельний олігонуклеотид 4, що містить два залишки флуоресцеїну на 3'- та 5'-кінцях. Вихід продукту 4 після електрофоретичного очищення становив близько 40%. Такі біс-мічені олігонуклеотиди можна застосову-

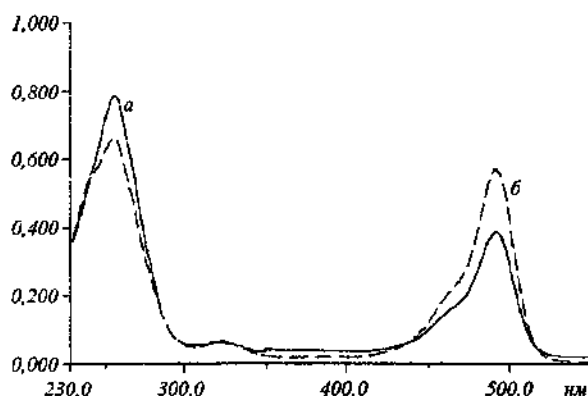


Рис. 2. Спектри електронного поглинання олігонуклеотидних кон'югатів у 0,05 М TEAB (рН 8): а — (dT)<sub>15</sub>-Flu (2); б — Flu-(dT)<sub>15</sub>-Flu (4)

вати як чутливіші порівняно з моно-міченими аналогами флуоресцентні зонди на НК.

Олігонуклеотиди, модифіковані флуоресцеїном, знесолювали за допомогою гель-фільтрації на сорбенті Sephadex G-25 (колонка PD-10 фірми «Pharmacia») в 0,05 М буфері TEAB, рН 7,8. Присутність невеликої кількості органічного розчинника в елюенті (3–5 % ацетонітрилу чи етанолу) зменшує неспецифічну сорбцію продуктів на сефадексі, особливо при виділенні подвійно мічених олігонуклеотидів.

UV-Vis спектри кон'югатів 2 та 4 (рис. 2) чітко демонструють присутність одного або двох залишків флуоресцеїну. Олігонуклеотидна частина не поглинає у видимій ділянці спектра, де спостерігається інтенсивна смуга барвника ( $\lambda_{\max} = 494$  нм), проте в ультрафіолетовій області (у ділянці 260 нм) поглинають як гетероциклічні основи нуклеотидів, так і барвник. Для (dT)<sub>15</sub> коефіцієнт екстинкції  $\epsilon_{260} = 122000$  (обчислено за методом [33]). Літературні дані щодо коефіцієнтів екстинкції флуоресцеїну у складі кон'югатів дещо різняться, що пов'язано з залежністю поглинання зазначеного барвника (особливо у видимій області спектра) від рН та низки інших факторів [34]. Після ковалентного приєднання барвника його поглинання у видимій області зменшується в середньому на 10 % [35]. За даними [35], для флуоресцеїну (у вигляді похідної FITC) в основному середовищі  $\epsilon_{260} = 13700$  і  $\epsilon_{494} = 68000$ . За даними ж роботи [36], ці коефіцієнти становлять відповідно 20900 і 73000.

Теоретичне співвідношення інтенсивностей поглинання кон'югатів в ультрафіолетовій та видимій

областях  $A_{260}/A_{494}$ , обчислене з використанням даних [35], становить 2,00 та 1,10 для моно- та біс-міченого (dT)<sub>15</sub>, а за даними [36] — відповідно 1,96 та 1,12. Ці значення добре узгоджуються з експериментальними даними, отриманими для кон'югатів 2 та 4 ( $A_{260}/A_{494}$  відповідно 2,04 та 1,18).

Отже, описано синтез кон'югатів олігонуклеотидів з одним та двома флуорофорами. Полімер 1 використано як носій для прямого твердофазного синтезу 3'-флуоресцеїнової похідної (dT)<sub>15</sub>, а 5'-функціоналізація отриманого кон'югату приводить до одержання олігомерів з двома репортерними групами. Метод придатний для одержання олігомерів з двома різними флуоресцентними мітками. До кон'югата 3 можна приєднати практично будь-яку репортерну молекулу, використавши її відповідну похідну, здатну до селективної модифікації аміногруп. Є можливість отримати олігомери з кінцевими модифікаціями двох різних типів, наприклад, 3'-флуоресцентно мічені олігонуклеотидні 5'-кон'югати з пептидами, хімічними нуклеазами чи іншими молекулами.

I. Ya. Dubey, L. V. Dubey, D. M. Fedoryak

Synthesis of 3'- and 3',5'-modified oligonucleotides on functionalized silica Silochrom-2

#### Summary

The preparation of 3'-mono- and 3', 5'-bis-labeled oligonucleotides on a new fluorescein-functionalized polymer support based on Silochrom-2 microspherical silica is described. Oligonucleotide (dT)<sub>15</sub> containing a dye residue at 3'-end was synthesized on this support by solid-phase phosphoramidite method. Post-synthetic 5'-modification of 3'-conjugate allowed obtaining double dye-labeled oligomer. In the future it will be used for the synthesis of fluorescent probe for nucleic acids detection.

Keywords: oligonucleotide conjugates, fluorescent labels, solid-phase synthesis, functionalization.

И. Я. Дубей, Л. В. Дубей, Д. М. Федоряк

Синтез 3'- и 3',5'-модифицированных олигонуклеотидов на функционализированном силикателе «Силохром-2»

#### Резюме

Описано получение 3'-моно- и 3',5'-бис-меченных олигонуклеотидов на новом полимерном носителе с использованием микросферического силикагеля «Силохром2», функционализированном флуоресцеином. На этом полимере твердофазным фосфитамидным методом синтезирован олигонуклеотид (dT)<sub>15</sub>, содержащий остаток красителя на 3'-конце. Постсинтетическая 5'-модификация 3'-конъюгата позволила получить олигомер, меченный двумя молекулами флуоресцеина. В будущем это будет использовано для синтеза флуоресцентных зондов для детекции нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: олигонуклеотидные конъюгаты, флуоресцентные метки, твердофазный синтез, функционализация.

## ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Goodchild J. Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties // *Bioconjugate Chem.*—1990.—1.—P. 165—187.
2. Beaucage S. L., Iyer R. P. The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives // *Tetrahedron.*—1993.—49.—P. 1925—1963.
3. *Protocols for oligonucleotide conjugates: synthesis and analytical techniques* // *Methods in molecular biology* / Ed. S. Agrawal.—Totowa: Humana press, 1993.—Vol. 26.—390 p.
4. Коршун В. А., Берлин Ю. А. Введение нерадиоактивных репортерных групп в синтетические олигонуклеотиды и их детекция // *Биоорг. химия.*—1994.—20, № 6.—С. 565—616.
5. *Synthesis of modified oligonucleotides and conjugates* // *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* / Eds S. L. Beaucage et al.—New York: John Wiley & Sons, 2003.—P. 4.0.1—4.9.28.
6. Reese C. B. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis // *Org. Biomol. Chem.*—2005.—3.—P. 3851—3868.
7. Da Ros T., Spalluto G., Prato M., Saison-Behmoaras T., Boutevine A., Cacciari B. Oligonucleotides and oligonucleotide conjugates: a new approach for cancer treatment // *Curr. Med. Chem.*—2005.—12.—P. 71—88.
8. Millar D. P. Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1996.—6.—P. 322—326.
9. *The Handbook—A guide to fluorescent probes and labeling technologies* // *In vitro Molecular Probes* / Ed. R. P. Haughland.—Eugene, 2005.—1136 p.
10. Dubey L. V., Dubey I. Y. Preparation of bifunctional silica polymer support for the synthesis of 3'-labeled oligonucleotides // *Биополімери і клітина.*—2005.—21, № 4.—С. 365—369.
11. Wachter L., Jablonski J., Ramachandran K. L. A simple and efficient procedure for the synthesis of 5'-aminoalkyl oligonucleotides // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14.—P. 7985—7994.
12. Agrawal S., Christodoulou C., Gait M. J. Efficient methods for attaching non-radioactive labels to the 5' ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14.—P. 6227—6245.
13. Theisen P., McCollum C., Upadhyaya K., Jacobson K., Vu H., Andrus A. Fluorescent dye phosphoramidite labelling of oligonucleotides // *Tetrahedron Lett.*—1992.—33.—P. 5033—5036.
14. Mullah B., Andrus A. Automated synthesis of double dye-labeled oligonucleotides using tetramethylrhodamine (TAMRA) solid supports // *Tetrahedron Lett.*—1997.—38.—P. 5751—5754.
15. Mullah B., Livak K., Andrus A., Keney P. Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay // *Nucl. Acids Res.*—1998.—26.—P. 1026—1031.
16. Korshun V. A., Balakin K. V., Proskurina T. S., Mikhalev I. I., Malakhov A. D., Berlin Y. A. A pyrene secopseudo-nucleoside in constructing interaction-sensitive fluorescent DNA probes // *Nucleosides and Nucleotides.*—1999.—18.—P. 2661—2676.
17. Stetsenko D. A., Gait M. J. A convenient solid-phase method for synthesis of 3'-conjugates of oligonucleotides // *Bioconjugate Chem.*—2001.—12.—P. 576—586.
18. Дубей І. Я., Ляпина Т. В., Федоряк Д. М. Мікросферический аэросилогель «Силохром-2» — высокоэффективный носитель для твердофазного синтеза олигонуклеотидов // *Биоорг. химия.*—1993.—19, № 5.—С. 589—592.
19. Behrens C., Dahl O. Synthesis of achiral linker reagents for direct labelling of oligonucleotides on solid supports // *Nucleosides and Nucleotides.*—1999.—18.—P. 291—305.
20. Laurent A., Debart F., Lamb N., Rayner B. Esterase-triggered fluorescence of fluorogenic oligonucleotides // *Bioconjugate Chem.*—1997.—8.—P. 856—861.
21. Agrawal S., Zamecnik P. C. Site specific functionalization of oligonucleotides for attaching two different reporter groups // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18.—P. 5419—5423.
22. Kahl J. D., McMinn D. L., Greenberg M. M. High-yielding method for on-column derivatization of protected oligodeoxynucleotides and its application to the convergent synthesis of 5', 3'-bis-conjugates // *J. Org. Chem.*—1998.—63.—P. 4870—4871.
23. Dubey I., Pratiel G., Meunier B. Modification of the thiourea linkage of fluorescein-oligonucleotide conjugate to a guanidinium motif during ammonia deprotection // *Bioconjugate Chem.*—1998.—9.—P. 627—632.
24. Ju J., Ruan C., Fuller C. W., Glazer A. N., Mathies R. A. Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92.—P. 4347—4351.
25. Glazer A. N., Mathies R. A. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses // *Curr. Opin. Biotechnol.*—1997.—8.—P. 94—102.
26. Okamura Y., Kondo S., Sase I., Suga T., Mise K., Furusawa I., Kawakami S., Watanabe Y. Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acids hybridization // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28.—P. e107.
27. Yamane A. MagiProbe: a novel fluorescence quenching-based oligonucleotide probe carrying a fluorophore and intercalator // *Nucl. Acids Res.*—2002.—30.—P. e97.
28. Wong M. L., Medrano J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation // *BioTechniques.*—2005.—39.—P. 75—85.
29. Metzker M. L. Emerging technologies in DNA sequencing // *Genome Res.*—2005.—15.—P. 1767—1776.
30. Dirks R. W., Tanke H. J. Advances in fluorescent tracking of nucleic acids in living cells // *BioTechniques.*—2006.—40.—P. 489—496.
31. Tyagi S., Kramer F. R. Molecular beacons — probes that fluoresce upon hybridization // *Nat. Biotechnol.*—1996.—14.—P. 303—308.
32. Isacson J., Cao I., Ohlson L., Nordgren S., Svanvik N., Westmen G., Kubista M., Sjöback R., Sehlstedt U. Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes // *Mol. Cell Probes.*—2000.—17.—P. 321—328.
33. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* / Ed. G. Fasman.—Boca Raton: CRC press, 1975.—Vol. 1.—175 p.
34. Sjöback R., Nygren J., Kubista M. Characterization of fluorescein-oligonucleotide conjugates and measurement of local electrostatic potential // *Biopolymers.*—1998.—46.—P. 445—453.
35. *Glen Research Product Files:* <http://www.glenres.com/index.html/ProductFiles/10-1963.html>
36. Edelman L. M., Cheong R., Kahn J. D. Fluorescence resonance energy transfer over ~130 basepairs in hyperstable Lac repressor-DNA loops // *Biophys. J.*—2003.—84.—P. 1131—1145.

УДК 577.113.6:542.95

Надійшла до редакції 26.10.06