

УДК 543.9

ИСКУССТВЕННЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 2024 г. Е. В. Супрун^{а, б, *}, С. А. Хмелева^б, К. Г. Птицын^б, Л. К. Курбатов^б, С. П. Радько^б

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, 119991 Москва, Россия

^бНаучно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
ул. Погодинская, 10, стр. 8, 119121 Москва, Россия

*E-mail: lenasuprun@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

В обзоре рассмотрены основные электрохимические свойства нуклеиновых кислот, проявляющиеся на твердых электродах, с акцентом на пространственную структуру макромолекул. Образование двойной спирали блокирует контакт электроактивных групп азотистых оснований с поверхностью электрода, вследствие чего аналитический сигнал дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) пропадает. Недостаточную электроактивность двунитевой ДНК преодолевают введением электрохимически активных фрагментов в последовательность нуклеиновых кислот путем полимеразного включения химически модифицированных нуклеотидов. В настоящее время синтезирована обширная библиотека искусственных нуклеотидов, содержащих различные электроактивные группы, способные как окисляться, так и восстанавливаться на поверхности электродов при различных потенциалах. Искусственные модифицированные нуклеотиды должны обладать высокой электрохимической активностью и одновременно быть хорошими субстратами ферментов (полимераз), участвующих в реакциях амплификации нуклеиновых кислот. Введение модифицированных нуклеотидов в полимеразную реакцию взамен природных — это компромисс между числом меток в одном ампликоне, длиной и количеством образующихся продуктов. Модифицированные нуклеотиды находят свое применение при выявлении мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов генов; при секвенировании нуклеиновых кислот; определении концентрации белков и пептидов; обнаружении патогенных вирусов и бактерий. С развитием методов изотермической амплификации разработка, синтез и исследование искусственных нуклеотидов стали весьма актуальными для создания новых внелабораторных электрохимических анализаторов нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: нуклеиновая кислота, модифицированный нуклеотид, изотермическая амплификация, полимеразная цепная реакция, флуориметрия, вольтамперометрия.

DOI: 10.31857/S0044450224070014, **EDN:** TOWFEY

Нуклеиновые кислоты, неся в себе генетическую информацию, являются неотъемлемой частью всех известных живых организмов и вирусов. В аналитической химии и биохимии нуклеиновые кислоты служат надежными маркерами микробного и вирусного заражения. Анализ образцов на нуклеиновые кислоты патогенных микроорганизмов используют в различных областях: в экологии, медицине, ветеринарии,

научных исследованиях, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Классическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) и бурно развивающиеся методы изотермической амплификации способны обеспечить определение нуклеиновых кислот на сверхнизких уровнях содержания, вплоть до нескольких копий в образце [1–3]. Если ПЦР-анализ требует термоциклирования (циклического чередование температур

для проведения синтеза, включая нагрев до 90 °С), то изотермические способы амплификации работают при постоянной температуре (около 30–60 °С), что значительно упрощает техническую сторону их проведения [1–3]. Теоретически некоторые изотермические реакции могут протекать и при комнатной температуре, но чуть медленнее, что делает возможным проведение амплификации *in situ*, держа пробирку в руке. Однако для применения в медицинских учреждениях “у постели больного” или в условиях “по месту требования” ПЦР и другие реакции амплификации нуклеиновых кислот нуждаются в подходящем инструментальном методе регистрации образующихся продуктов – ампликонов. Чаще всего продукты амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) – это двунитевые молекулы размером от одной до нескольких сотен пар оснований (п. о.), однако в некоторых видах изотермических реакций ампликоны имеют одонитевую или смешанную, достаточно экзотическую структуру. В поисках надежных, портативных и чувствительных систем обнаружения нуклеиновых кислот объединение принципов электрохимического анализа с биохимическими способами амплификации ДНК или рибонуклеиновой кислоты (РНК) представляет большой интерес [4–7]. Электрохимическое определение структуры и концентрации нуклеиновых кислот является особенно привлекательной альтернативой оптическим методам, благодаря своей высокой чувствительности, сравнительно простому инструментарию и относительно низкой стоимости. Среди известных стратегий обнаружения нуклеиновых кислот прямая вольтамперометрическая регистрация ДНК или РНК может обеспечить быстрый и экономичный анализ биологических образцов *in situ*. Под “прямой” вольтамперометрической регистрацией понимают считывание аналитического сигнала, используя электроактивные свойства самих молекул нуклеиновых кислот, без применения каких-либо внешних редокс-индикаторов или медиаторов. Один из возможных путей решения данной задачи – получение продуктов амплификации нуклеиновых кислот посредством полимеразного встраивания нуклеотидов, модифицированных электроактивными группами [8, 9]. Обоснование, общие принципы, достоинства и ограничения применения искусственных модифицированных нуклеотидов в качестве электроактивных меток для

вольтамперометрического обнаружения ДНК и в меньшей степени РНК рассмотрены в настоящем обзоре.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ТВЕРДЫХ ЭЛЕКТРОДАХ

Нуклеиновые кислоты – биополимеры, способные электрохимически восстанавливаться и окисляться на поверхности электродов из различных материалов [10, 11]. В настоящее время электрохимия нуклеиновых кислот основана на их необратимом окислении на твердых (углеродных, золотых) электродах [12–17]. Известно, что нуклеиновые кислоты способны окисляться за счет остатков азотистых оснований: гуанина (Г), аденина (А), тимина (Т), цитозина (Ц) и урацила (У) [15–22]. Для свободных нуклеотидов на электродах из углеродных материалов электроактивность азотистых оснований проявляется анодными пиками при потенциалах 0.9–1.0 В (гуанозинмонофосфат, ГМФ), 1.2–1.3 В (аденозинмонофосфат, АМФ), 1.4–1.5 В (тимидинмонофосфат, ТМФ) и 1.5–1.6 В (цитидинмонофосфат, ЦМФ) (отн. Ag/AgCl, pH 7.4) [19, 23]. Интересно, что добавление остатков сахара и фосфата к азотистому основанию (с образованием нуклеозида и затем нуклеотида) сдвигает потенциал пика окисления к более высоким положительным значениям [24–29]. Соответственно показано, что гидролиз олигонуклеотидов ДНК до азотистых оснований сдвигает потенциалы окисления пиков обратно к меньшим положительным значениям [30]. Механизмы реакций окисления Г, А, Т, Ц и У на электродах из углеродных материалов детально исследованы и обсуждены в литературе [18, 19, 24–33]. Однако отчетливые сигналы окисления всех азотистых оснований получены только для нуклеотидов, некоторых коротких олигонуклеотидов и гомополинуклеотидов [19, 22, 23, 30–38]. Сигналы окисления ДНК- и РНК-олигонуклеотидов в основном генерируют остатки Г и А [23, 30, 37, 38]. На примере синтетических 15- и 19-членных ДНК-олигонуклеотидов показано [23], что только остатки Г и в некоторой степени А всегда дают отчетливые отклики на поверхности электрода даже при самом низком содержании данных азотистых оснований в олигонуклеотидной цепи. Анодный пик Г можно наблюдать на вольтамперограммах, даже если в олигонуклеотидной цепи присутствует только один остаток Г.

Среди азотистых оснований только сигнал окисления Г чувствителен как к концентрации олигонуклеотидов, так и к их составу [23]. Известно, что на вольтамперометрический отклик молекулы олигонуклеотида сильно влияют состав и последовательность нуклеотидов в цепи, а также ее длина [23, 37, 38]. В молекуле олигонуклеотида остатки разных азотистых оснований “мешают” друг другу проявиться в виде четких пиков окисления на вольтамперограммах. Только последовательно убирая из цепи остатки нуклеотидов определенного вида, можно достоверно зарегистрировать сигналы окисления остальных нуклеотидов [38]. Другая важная взаимосвязь — зависимость вольтамперометрических сигналов от пространственной структуры молекулы олигонуклеотида — показана в ряде работ на примере G-квадруплексов [36, 38–40]. G-квадруплекс — это структура молекул ДНК или РНК с последовательностями, обогащенными остатками Г (англ. G), в которых Г спарены за счет неканонических водородных связей Хугстина с образованием плоской матрицы, которая дополнительно стабилизируется взаимодействиями между положительно заряженными ионами и неподеленными электронными парами Г [41]. G-квадруплексы могут быть образованы одной, двумя, тремя или четырьмя полинуклеотидными цепями. Формирование как внутри-, так и межмолекулярных G-квадруплексов зависит от нуклеотидной последовательности и состава раствора. Последние данные свидетельствуют об участии G-квадруплексов в ключевых функциях генома, таких как транскрипция, репликация, стабильность генома и эпигенетическая регуляция, а также об их роли в биологии онкологических заболеваний [41]. Таким образом, можно заключить, что потенциалы и высоты пиков окисления азотистых оснований в одонитевых ДНК (онДНК) и РНК слишком сильно зависят от концентрации, последовательности и пространственной структуры олигонуклеотидов, что затрудняет их использование для решения сложных аналитических задач. С увеличением длины олигонуклеотида величины сигналов окисления остатков азотистых оснований падают [38]. Интересно, что сверхдлинная одонитевая ДНК (онДНК) в несколько десятков тысяч нуклеотидов — продукт реакции репликации по типу катящегося кольца (англ. Rolling Circle Amplification, RCA) [42, 43] — не может напрямую быть зарегистрирована вольтамперометрически из-за высоких фоновых токов [38]. Только ферментативная

“нарезка” сверхдлинной онДНК на фрагменты длиной ~70 нуклеотидов привела к появлению на вольтамперограммах кривых, характерных для олигонуклеотидов [38].

В отличие от синтетических олигонуклеотидов с искусственным несбалансированным содержанием нуклеиновых оснований и/или неслучайными последовательностями, в нативной ДНК все четыре вида азотистых оснований в среднем представлены в равной степени, а их общая последовательность случайна. Для гетерогенных препаратов ДНК из природных источников выявлены пики окисления только при 0.7–0.9 и 0.9–1.2 В (отн. Ag/AgCl) [44–50]. Эти пики отнесены к электрохимическому окислению остатков Г и А соответственно [24–29, 47]. Следует отметить, что токи пиков окисления для нативной двунитевой ДНК (днДНК) заметно ниже по сравнению с сигналами от денатурированной ДНК [44, 45, 47, 51, 52]. Кроме того, обнаружено, что токи окисления ДНК (как для нативных, так и для денатурированных биополимеров) уменьшаются с увеличением молекулярной массы ДНК [46]. Более того, продемонстрировано, что низкомолекулярные компоненты (окисляемые на электродах из углеродных материалов) даже при относительно низкой (микромольной) концентрации могут существенно влиять на результаты электроокисления ДНК [46]. Интересно, что для регистрации сигналов окисления нативной днДНК, денатурированной ДНК и даже коротких олигонуклеотидов на стеклоуглеродных и золотых электродах требовалась предварительная поляризация электрода при высоких положительных потенциалах (от 0.5 до 1.3 В; в течение 15 мин), вероятно, из-за более эффективной адсорбции отрицательно заряженных биомолекул на положительно заряженных электродах [48, 52]. С увеличением молекулярной массы нативной ДНК можно ожидать уменьшения электрохимических сигналов остатков Г и А [46, 53]. Более того, когда активные центры нуклеиновых оснований связаны водородными связями и таким образом скрыты внутри двойной спирали Уотсона–Крика, они, очевидно, становятся недоступными для электродных реакций [8, 14, 21, 53, 54]. Таким образом, низкомолекулярные фрагменты онДНК, по-видимому, вносят основной вклад в суммарные токи электроокисления, генерируемые остатками Г или А в гетерогенных препаратах ДНК природного происхождения, без заметного вклада высокомолекулярной днДНК [53]. Электрохимическое

поведение как коротких, так и длинных молекул онДНК еще до конца не изучено, и многие детали взаимосвязи между электрохимической активностью нуклеиновых кислот и их последовательностью и молекулярной структурой требуют систематического и более глубокого исследования. Очевидно, что вольтамперометрия нуклеиновых кислот проигрывает в чувствительности и селективности из-за высоких потенциалов окисления и низких значений регистрируемых токов. Это ставит под сомнение пригодность прямого электрохимического анализа (без предварительного гидролиза) для обнаружения относительно крупных молекул онДНК, таких как фрагменты, получаемые с помощью ПЦР.

СТРАТЕГИЯ МЕЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ

Для решения проблемы низкой электрохимической активности нуклеиновых кислот чешские ученые Хочек и Фойта использовали мечение полинуклеотидных последовательностей

электроактивными группами путем ферментативного включения в цепи ДНК или РНК нуклеотидов с химически модифицированными основаниями [8, 9, 55] (рис. 1). Функциональные нуклеиновые кислоты, такие как аптамеры, соматеры и ДНКзимы, достаточно давно известны и активно используются в биохимии и биоаналитической химии [55]. Модифицированные нуклеотиды появились с целью придания нуклеиновым кислотам особых свойств. Введение различных функциональных групп, особенно модификация остатков нуклеиновых оснований, позволило расширить области применения синтетических нуклеиновых кислот. Изначально производные нуклеотидов, содержащие электроактивные группы, такие как фенотиазин, порфирин, комплексы $\text{Ru}_3^{\text{II}(\text{bpy})}$ и $\text{Os}_3^{\text{II}(\text{bpy})}$ (где bpy – бипиридил), 1,10-фенантролин, красители TAMRA, флуоресцеин, родамин, Cu_3 и Cu_5 [55–66], присоединяемые к остатку азотистого основания, были успешно синтезированы, но использовались лишь в качестве флуоресцентных меток, а их электрохимические свойства не изучались. Другим активно развивающимся направлением модификации нуклеотидов,

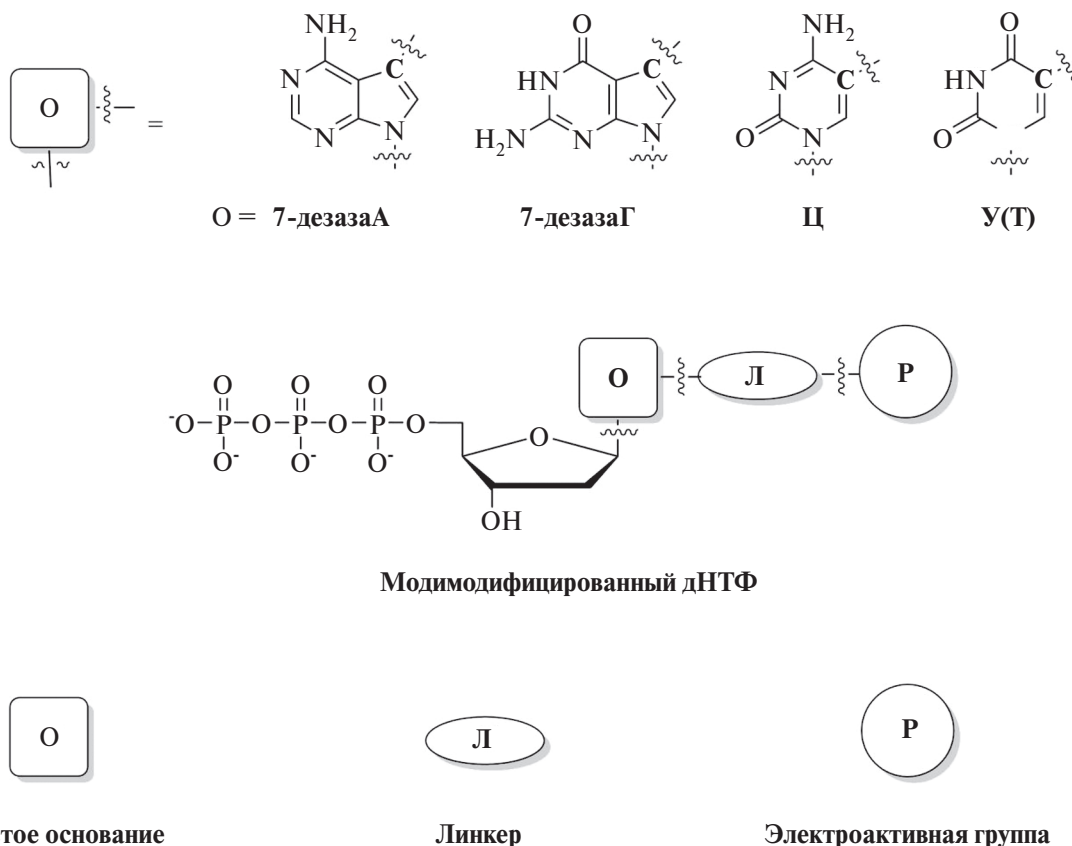


Рис. 1. Модификация нуклеотидов электроактивными группами. На примере ДНК-нуклеотида.

в том числе электроактивными группами, служит придание полинуклеотидным последовательностям сродства к определенным лигандам (пептидам, белкам, низкомолекулярным соединениям) [67–72].

За последние два десятилетия для целей электрохимии создана и протестирована целая палитра нуклеозидов и нуклеотидов с присоединенными фрагментами металлоорганических соединений (ферроцен) [73–78], хелатов переходных металлов [79], полиоксометаллатов [80, 81] или органических функциональных групп, способных восстанавливаться или окисляться на поверхности электрода [73, 82–95]. Как показано на рис. 1, при синтезе модификация нуклеотидов идет по азотистому основанию путем прямого или косвенного (через спейсер) присоединения электроактивного фрагмента к пуриновому (А, Г) или пиримидиновому (Т, У, Ц) основанию. Присоединение новой группы идет в положение С5 пиримидинового основания или в положение С7 пуринового основания. Синтетические нуклеотиды могут быть введены в последовательность нуклеиновых кислот путем различных ферментативных реакций при частичной или полной замене природных нуклеотидов в реакционной смеси. Образующаяся в результате молекула ДНК или РНК несет в себе новые электроактивные группы. Исходя из принципа метода, очевидны два основных требования, которым должен удовлетворять искусственный нуклеотид. Во-первых, модифицированный нуклеотид должен обладать высокой электрохимической активностью, в отличие от природного нуклеотида, обеспечивая селективное и чувствительное определение содержания модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты в образце при относительно низких потенциалах окисления или восстановления. Во-вторых, немаловажна совместимость синтетического нуклеотида с электроактивной меткой с ферментами, используемыми в реакциях амплификации нуклеиновых кислот. Дизайн, синтез и проверка производных нуклеотидов на электрохимическую активность и субстратную совместимость с ДНК-полимеразами — новое современное направление на стыке органической химии, биохимии и аналитической химии (в частности, электрохимии). Данный подход позволил значительно повысить чувствительность и селективность электрохимического определения концентрации нуклеиновых кислот. К сожалению, большинство опубликованных Хочеком и Фойтой работ [96–102]

посвящено исследованию электрохимической активности модифицированных нуклеотидов на ртутном или содержащем ртуть электродах, что не имеет каких-либо перспектив практического применения в современном “зеленом” мире. Стоит отметить, что существующее разнообразие конъюгатов нуклеотидов с различными электроактивными группами обеспечивает основу для мультипотенциального кодирования ДНК с перспективой электрохимического определения последовательности нуклеиновых кислот при их секвенировании (рис. 2) [8, 9, 55, 73–103]. Термин “мультипотенциальное кодирование ДНК” означает расшифровку последовательности ДНК на основе введения в нее электроактивных меченых нуклеотидов взамен природных нуклеотидов (вплоть до всех четырех). Каждая электроактивная метка, характеризующаяся потенциалом и интенсивностью пика и соответствующая определенному нуклеиновому основанию, должна обладать ортогональностью и рациометричностью, т.е. давать вольтамперометрический сигнал, не перекрывающийся с сигналами других меток и зависящий от количества нуклеотидов данного вида в цепи. Например, модифицированные нуклеотиды, связанные с различными электроактивными фрагментами, недавно были успешно применены для мультипотенциального кодирования всех четырех оснований ДНК [78, 103]. Кроме того, искусственные электроактивные нуклеотиды используют для регистрации гибридизации ДНК, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, обнаружения повреждения ДНК и определения содержания белков (рис. 3) [8, 9, 55, 73–103]. Другим многообещающим практическим применением модифицированных нуклеотидов является сочетание изотермической амплификации ДНК с электроактивными мечеными нуклеотидами для электрохимической регистрации нарабатываемых ампликонов и обнаружения инфекционных агентов *in situ* (рис. 3) [89]. Однако, чтобы стать широко применимой для обнаружения нуклеиновых кислот “по месту требования”, данная стратегия должна включать: (1) простую процедуру регистрации сигнала, исключаящую использование токсичной ртути или стадию шлифовки поверхности электродов; (2) набор модифицированных нуклеотидов, содержащий основания ДНК или РНК, конъюгированные с электроактивными фрагментами, которые подходят в качестве субстратов полимераз, осуществляющих амплификацию нуклеиновых кислот. В этой связи прямое

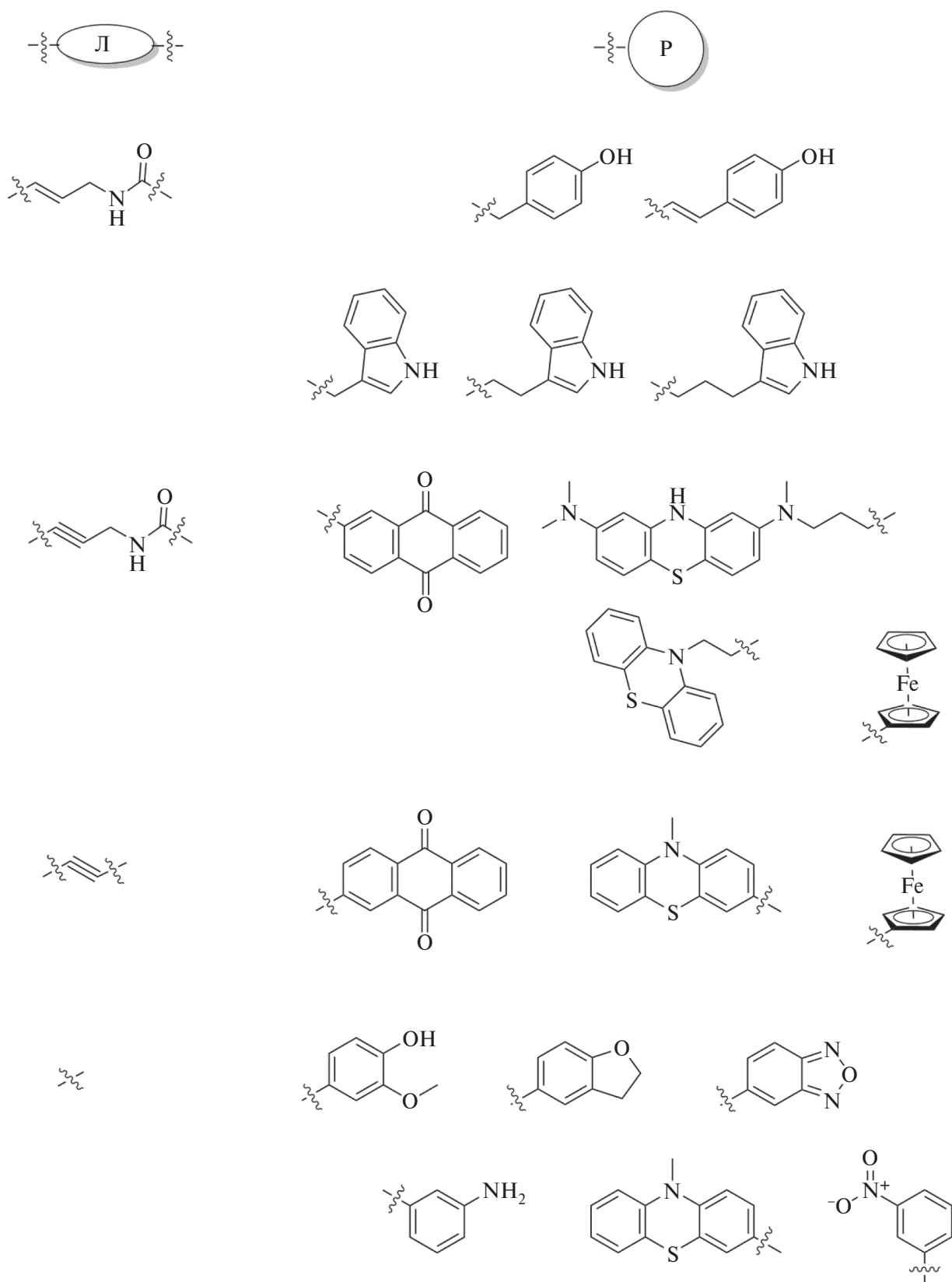


Рис. 2. Разнообразие электроактивных групп и линкеров в синтетических модифицированных нуклеотидах: ферроцен [74–77, 103–105], антрахинон [83, 91], 4-гидрокси-3-метоксифенил и 2,3-дигидробензофуран-5-ил [84], фенотиазин [85], остатки тирозина и триптофана [88, 89], 3-аминофенил и 3-нитрофенил [87, 106], бензофуразан [98]. Л – линкер, Р – электроактивная функциональная группа.

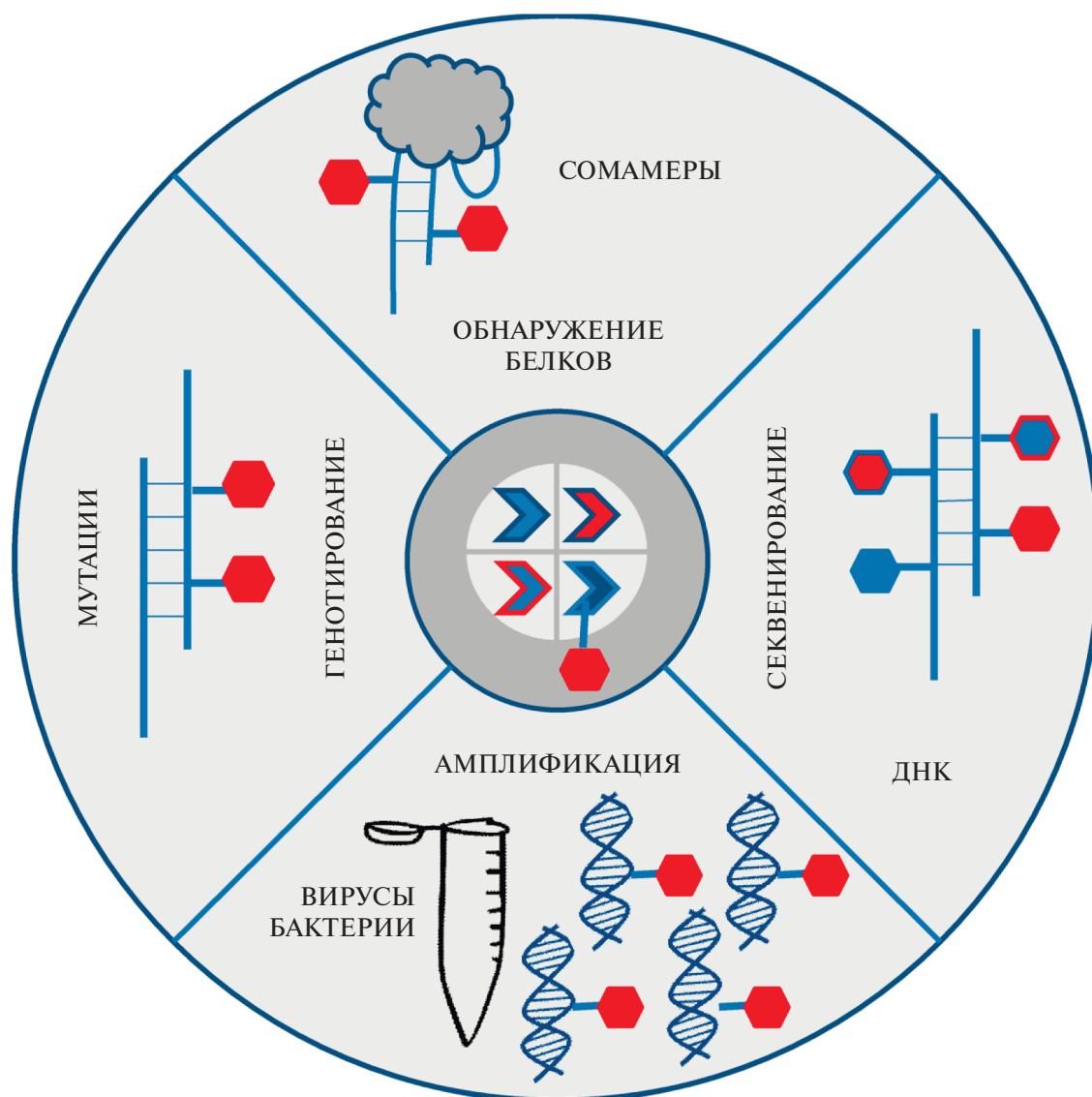


Рис. 3. Основные сферы применения искусственных электроактивных нуклеотидов.

электрохимическое обнаружение модифицированных молекул нуклеиновых кислот с помощью одноразовых печатных графитовых или золотых электродов может обеспечить технически простой, быстрый и экономичный подход к оценке результатов изотермической амплификации ДНК [88].

РАЗНООБРАЗИЕ НУКЛЕОТИДОВ С ЭЛЕКТРОАКТИВНЫМИ МЕТКАМИ

Модифицированные по азотистым основаниям нуклеотиды получают либо классическим трифосфорилированием модифицированных нуклеозидов, либо с помощью простых одностадийных реакций перекрестного связывания галогенированных дезоксинуклеозидтрифосфатов

(дНТФ) в воде [55, 83]. Напомним, что синтез производных нуклеотидов требует присоединения новой группы к остатку азотистого основания либо непосредственно, либо через линкер в положении С5 цитозина и урацила, либо в положении С7 7-дезааденина и 7-дезагуанина (рис. 1) [73, 74, 76–78, 83–85, 87, 92, 98, 104]. Это делает производные дАТФ и дГТФ более отдаленными аналогами природных нуклеотидов, чем конъюгаты дЦТФ и дУТФ (дТТФ) [92]. С5-замещенные пиримидиновые и С7-замещенные 7-дезапуриновые дНТФ обычно являются хорошими субстратами ДНК-полимераз, тогда как С8-замещенные пуриновые дНТФ — плохими [55, 83]. Также известно, что ацетиленовый спейсер между объемным ароматическим заместителем и азотистым основанием улучшает

субстратные свойства модифицированных дНТФ [83].

Палитра модифицированных нуклеотидов с электроактивными метками насчитывает несколько десятков соединений — производных всех видов природных нуклеотидов: дГТФ, дАТФ, дТТФ (дУТФ) и дЦТФ. Электроактивными группами в таких искусственных нуклеотидах выступают: цианиновые красители Cu3 и Cu5 [63–66], метиленовый синий [73], ТЕМРО [94], нильский синий [95], ферроцен [73–78, 103–109], антрахинон [73, 83, 91, 94, 106, 107], остатки тирозина и триптофана [88, 89], 5-(4-азидо-фенил) [97], бензофуразан [98], аминифенил и нитрофенил [82, 87, 110], фенотиазин [73, 85], 4-гидрокси-3-метоксифенил и 2,3-дигидробензофуран-5-ил [84], карборан или металакарборан [78], флуоресцеин и родамин [90]. Примеры структур электроактивных остатков модифицированных нуклеотидов в сочетании с линкерами приведены на рис. 2. Электрохимическое поведение искусственных меченых нуклеотидов изучают различными методами, как правило, включающими циклическую вольтамперометрию в комбинации с квадратно-волновой или дифференциальной импульсной вольтамперометрией. Необходимо отметить, что многие красители обладают электрохимической активностью и могут выступать как в роли флуоресцентных, так и электроактивных меток [90, 111]. В пионерских работах электроактивные нуклеотиды ДНК и РНК названы “электротидами” (от англ. *electrotide*) [106, 107]. Остаток гуанина или 7-дезагуанина может выступать в качестве самостоятельной электроактивной метки в онДНК из-за природной электроактивности гуанина [78, 83, 96, 103, 104]. Если нуклеотиды, меченные флуоресцентными метками, такими как флуоресцеин, родамин, Cu3 , Cu5 , коммерчески доступны, то большинство нуклеотидов с электроактивными метками синтезированы только в рамках конкретных научных проектов. В большинстве работ в качестве меток нуклеотидов выступают функциональные группы с заведомо известными электрохимическими свойствами [112]. Так, электрохимическое окисление фенольных и индольных соединений достаточно подробно изучено [113–115]. Тем не менее на электрохимическое поведение меток в составе конъюгатов с нуклеотидами влияют природа нуклеотида и условия проведения измерений (состав фонового электролита, pH среды, материал электрода). Нуклеотиды дАМФ, дЦМФ, дАТФ и дЦТФ,

меченные 4-гидрокси-3-метоксифенилом, демонстрируют первый пик окисления при 0.3–0.5 В [84]. Конъюгаты дАМФ и дЦМФ с фенотиазином окисляются при потенциале около 0.6 В [85]. Сигналы окисления дАМФ, дЦМФ, модифицированных 2,3-дигидробензофураном, находятся в диапазоне 0.8–1.1 В (электрод из пиролитического графита, ацетатный буферный раствор, pH 5.0) [84]. Производные дУТФ, модифицированные остатками тирозина или триптофана, дают четкие пики окисления при 0.5–0.7 В (печатный графитовый электрод, фосфатный или Трис-буферный раствор, нейтральная среда) [88, 89]. Нуклеотиды дАТФ и дЦТФ, модифицированные по азотистым основаниям окислительно-восстановительными группами, такими как ферроцен и его производные (с обратимым сигналом в диапазоне 0.05–0.5 В) [75] или антрахинон (с парой обратимых пиков при потенциале около –0.4 В) [83] продемонстрировали электроактивность при более низких значениях потенциала. Ферментативное кодирование нуклеиновых кислот требует набора нуклеотидов, конъюгированных с электроактивными группами, имеющими различные окислительно-восстановительные потенциалы, так что каждая из них может быть считана в присутствии других, давая отчетливый сигнал [85].

Среди электроактивных фрагментов, способных восстанавливаться на поверхности электродов при относительно низких отрицательных потенциалах, наиболее распространение получила ароматическая нитрогруппа [82, 87, 110]. Ароматическая нитрогруппа рассматривается как перспективная метка в стратегии мультипотенциального вольтамперометрического кодирования ДНК [82, 83, 87, 91]. Классическая схема восстановления ароматической нитрогруппы на ртутном электроде в кислой среде дана в обзоре 1978 г. [116]. Позднее механизм электровосстановления нитрогруппы был предметом детального исследования в работах Зумана и Лавирона [117, 118]. Интересно, что ароматическое нитросоединение нитробензол было первой органической молекулой, изученной методом полярографии еще в 1925 г. [119]. Восстановление ароматической нитрогруппы дает на вольтамперограмме необратимый пик при потенциалах примерно от –0.35 до –0.65 В и пару пиков – $\text{NHOH}/\text{—NO}$ при потенциале около 0 В, появляющуюся в результате окисления – NHOH и дальнейшего восстановления – NO [82, 83, 87, 92, 98, 102]. Следует отметить, что для

наблюдения окислительно-восстановительной пары —NHON/—NO на циклических вольтамперограммах требуются два последовательных скана [86, 91]. Обычно токи пиков окислительно-восстановительной пары —NHON/—NO значительно ниже значения тока пика восстановления самой ароматической нитрогруппы. На ртутном электроде для олигонуклеотида, меченного 3-нитрофенильной группой, получен симметричный пик восстановления при -0.5 В, в то время как его отклик на электроде из пиролитического графита довольно слабый [87], что, скорее всего, вызвано разной степенью адсорбции анализируемого олигонуклеотида на ртути и углероде. К сожалению, в настоящее время отсутствуют публикации, в которых был бы досконально изучен механизм восстановления нитрофенильной группы на электродах из углеродных материалов. Синтезирован полный набор нуклеотидов, модифицированных нитрофенильной группой; нитропроизводные дГТФ, дАТФ, дЦТФ или дУТФ успешно включены в цепи ДНК посредством различных ферментативных реакций как по отдельности, так и в смеси с другими модифицированными нуклеотидами [82, 83, 86, 87, 91, 110]. В дополнение к нуклеотидам, меченным одной электроактивной группой, ароматическая нитрогруппа использовалась в составе полифункциональных фрагментов, в частности в нуклеотидах, меченных 2,4-динитрофенилгидразом, нитробензофуразаном [92] или N-метил-4-гидразино-7-нитробензофуразаном [102].

Следует отметить, что наблюдаемые различия в значениях потенциалов пиков модифицированных нуклеотидов обусловлены не только природой электроактивного фрагмента, но и различием в длине и структуре спейсера, с помощью которого электроактивная группа конъюгирована с азотистым основанием нуклеотида. В частности, данный эффект наблюдали для дУТФ, модифицированных ароматическими группами тирозина, триптофана [88, 89], или ферроцена [106, 108]. Значения токов и потенциалов пиков окисления или восстановления модифицированных нуклеотидов сильно зависят от параметров регистрации вольтамперограмм, например скорости развертки потенциала, а также от общих условий эксперимента — материала электрода, состава фонового электролита, pH среды. В зависимости от условий эксперимента различные дезоксинуклеозидтрифосфаты, меченные нитрофенильной группой (в основном

производные дАТФ и дЦТФ), генерировали пики восстановления ароматической нитрогруппы при потенциалах: от -0.5 до -0.65 В (ацетатный буферный раствор, pH 5.0 и Трис-буферный раствор, pH 7.3) на электроде из пиролитического графита [82, 87]; около -0.35 или -0.5 В (ацетатный буферный раствор, pH 5.0) [87, 92] и около -0.45 В (формиат аммония + фосфат натрия, pH 6.9) [91] на ртутном электроде; около -0.6 В (ацетатный буферный раствор, pH 5.0) на алмазном электроде, допированном бором [86]. Кроме того, показано, что значения токов и потенциалов регистрируемых пиков (восстановления или окисления) меченых дНТФ сильно зависят от типа модифицированного азотистого основания [75, 82, 86, 87, 91, 92]. Например, значения потенциалов пиков восстановления дНТФ, меченных 3-нитрофенилом, увеличиваются в ряду $\text{дГТФ} < \text{дЦТФ} < \text{дАТФ} < \text{дУТФ}$ (дТТФ), что указывает на наиболее трудное восстановление ароматической нитрогруппы в дУТФ (при -0.665 В, электрод из пиролитического графита, Трис-буферный раствор, pH 7.3) [82, 87].

Основной задачей многих экспериментальных работ стало получение новых модифицированных нуклеотидов и изучение их электрохимических свойств с целью выбора метки, способной окисляться или восстанавливаться при наиболее низких положительных или отрицательных потенциалах с высокой аналитической чувствительностью для последующего определения концентрации ДНК или регистрации нуклеотидных замен и мутаций [74, 76, 77, 78, 103]. При этом сигнал введенной метки может накладываться на сигналы остатков Г и/или А в ДНК-олигонуклеотидах, чего лучше избегать. Кроме того, желательно, чтобы встроенная метка давала только один четкий пик окисления или восстановления без каскада электрохимических превращений. При выборе метки немаловажное значение имеет, обладает ли новая группа интеркалирующим эффектом в ДНК. Например, остатки тирозина и триптофана не включены в список интеркаляторов ДНК, в отличие от метиленового синего [73] или комплексов катионов металлов с полициклическими ароматическими лигандами [79]. На практике выбор четырех электроактивных групп, дающих при совместном присутствии отдельные сигналы на вольтамперограмме, является непростой задачей. Одновременно проводят биохимические исследования с целью выяснить, насколько хорошим субстратом ДНК- или РНК-полимераз является искусственный нуклеотид

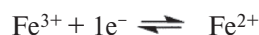
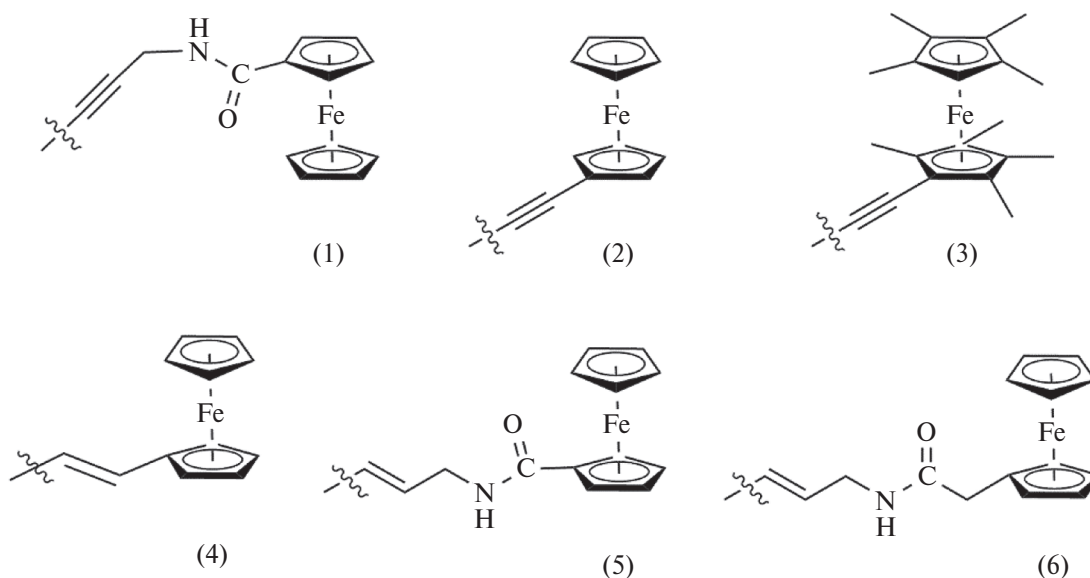


Рис. 4. Ферроцен и его производные в качестве электроактивных меток нуклеотидов: ферроценкарбоксамид (1), незамещенный ферроцен (2), октаметилферроцен (3), ферроценвинил (4), 5-(3-ферроценкарбоксамидопропенил-1) (5) и 5-(3-ферроценацетамидопропенил-1) (6), связанные линкером с атомом углерода С7 или С5 пуринового или пиримидинового азотистого основания нуклеотида (ДНК или РНК) соответственно [74–78, 103–109, 120]. Для модифицированных дУТФ от (1) к (3) [75], от (4) к (5) [106] и от (6) к (5) [108] значения потенциалов пиков окисления возрастают.

по сравнению с природным, включая его в различные реакции амплификации.

На сегодняшний день широкое распространение получили нуклеотиды, меченные ферроценом и его производными (рис. 3) [74–78, 103–109, 120]. Заместители в молекуле ферроцена сильно влияют на потенциалы окисления модифицированных нуклеотидов [121]. Конъюгаты с ферроценом получены для всех дНТФ, а ферроценовые производные дАТФ и дЦТФ стали коммерчески доступными через Jena Bioscience (<https://www.jenabioscience.com>) [76]. Это достижение стало результатом многолетних совместных исследований ученых из разных стран. Например, сконструированы и синтезированы три 7-дезаадениновых и цитозиновых нуклеозидтрифосфата, содержащих незамещенный ферроцен, октаметилферроцен или ферроценкарбоксамид, связанные алкиновым линкером в положении С7 или С5 соответственно (рис. 4) [75]. Электрохимическое поведение модифицированных ферроценом нуклеотидов изучали с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии на электроде из пиролитического графита (ацетатный буферный раствор, pH 5.0). Производные дНТФ, конъюгированных с разными

производными ферроцена, продемонстрировали вольтамперометрические пики, соответствующие обратимому одноэлектронному окислению фрагмента ферроцена [75]. В случае конъюгатов ферроцена с 7-дезааденином наблюдали дополнительный пик необратимого окисления пирролопиримидиновой группы при 1.03–1.10 В (отн. Ag/AgCl). Обогащенный электронами октаметилферроцен окисляется при потенциале, примерно на 300 мВ более низком, чем потенциал окисления незамещенного ферроцена. Данная модификация молекулы ферроцена облегчает его окисление, однако ведет к нестабильности меток на воздухе. С другой стороны, обедненные электронами связанные амидной связью производные ферроцена дают сигнал окисления, смещенный примерно на 100 мВ к более высоким значениям. Нуклеотиды, содержащие октаметилферроцен, демонстрируют дополнительный необратимый пик при 1.20 В [75]. Поскольку меченные октаметилферроценом нуклеотиды и олигонуклеотиды склонны к окислению на воздухе, дальнейшие исследования проводили только на стабильных производных, содержащих незамещенный ферроцен и карбоксамидоферроцен [75]. Конъюгация

нуклеотида с электроактивными функциональными группами может приводить как к смещению потенциала окисления или восстановления метки по сравнению с ее свободной формой, так и не менять его. Так, свободный ферроцен дает хорошо выраженный пик, благодаря обратимому одноэлектронному окислительно-восстановительному процессу Fe(II)/Fe(III) при 0.245 В (электрод из пиролитического графита, Трис-буферный раствор, pH 7.3) [104]. Аналогичные обратимые электрохимические сигналы наблюдали для несущих ферроценовые метки на ацетиленовых линкерах дУТФ и дАТФ: потенциалы их окисления заметно смещены (на 105 мВ и 155 мВ соответственно) по сравнению со свободным ферроценом. Электроноакцепторные эффекты электронного сопряжения ароматических нуклеиновых оснований и меток затрудняют окисление комплексов металлов по сравнению с несвязанными комплексами (в данном случае ферроцена), что приводит к положительным сдвигам окислительно-восстановительных потенциалов. Влияние 7-дезададенина на окислительно-восстановительный потенциал ферроценовой метки более значимо, чем влияние урацилового остатка. Результирующая разница в потенциалах пиков окисления модифицированных ферроценом нуклеотидов (около 50 мВ) достаточна для обеспечения дифференциации между конъюгатами дУТФ и дАТФ [104]. На примере нуклеотидов дУТФ, меченных ферроценом, также прослеживается зависимость окислительно-восстановительных потенциалов пары пиков Fe(II)/Fe(III) от длины линкера, связывающего метку и нуклеотид [106, 108]. Так, два меченных ферроценом аналога дТТФ, 5-(3-ферроценкарбоксамидопропенил-1) дУТФ (дУТФ-**Fc1**) и 5-(3-ферроценацетамидопропенил-1) дУТФ (дУТФ-**Fc2**) (рис. 4), на циклических вольтамперограммах показали обратимое окислительно-восстановительное поведение ферроценильных фрагментов в Трис-ацетатном буферном растворе со значениями $E_{1/2}$, равными 398 и 260 мВ соответственно (отн. Ag/AgCl , pH 7.4) [108]. На циклической вольтамперограмме интервал между потенциалами пиков окисления и восстановления дУТФ-**Fc1** составил 60 мВ, что соответствует обратимой окислительно-восстановительной реакции ферроценильного фрагмента в данной буферной системе. Окислительно-восстановительный потенциал дУТФ-**Fc1** на 90 мВ превышает потенциал ферроценкарбоксилата (310 мВ, отн. Ag/AgCl),

измеренный в том же буферном растворе, что отражает замену заместителя пентадиенильного кольца на более электроноакцепторный ($-\text{COO}^-$ на $-\text{CONHR}$) [108].

Первоначально метод ферментативного введения электроактивных меток в нуклеиновые кислоты был сосредоточен на мультипотенциальном кодировании ДНК путем объединения нескольких ортогональных (дискретных) функциональных групп для разработки методов электрохимического определения оснований при секвенировании нуклеиновых кислот [8, 78, 82, 83, 85, 87, 91, 98, 103]. Идея использования электроактивных меток для мультипотенциального кодирования требовала мечения всех четырех нуклеотидных оснований в качестве альтернативы многоцветному флуоресцентному методу. В этом ключе большие надежды возлагались на ароматическую нитрогруппу, дающую четкий пик восстановления, в сочетании с другими метками, способными окисляться на поверхности электрода [82, 91]. Другой подход — гибридизация иммобилизованного ДНК-праймера с исследуемой последовательностью, а затем ферментативное удлинение с помощью реакции удлинения праймера (англ. primer extension reaction, **PEX**) [78, 103]. Однако из-за довольно узких рабочих окон потенциалов (отличающихся на разных электродах), применимых для анализа ДНК, и трудностей в разработке и синтезе ортогональных и радиометрических электроактивных меток этот подход долгое время оставался нереализованным. Только недавно разработан и опубликована комбинация из четырех окисляемых меток (дикарбанидоундекаборат ($[\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^-$); [3,3-железо-бис(1,2-дикарболлид)]- ($[\text{Fe}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^{2-}$); 7-ферроценилэтинил и 7-деазагуанин), которые могут быть присоединены к четырем нуклеотидам, ферментативно включаемым ДНК-полимеразой в олигонуклеотидные цепи, содержащие до 16 модифицированных нуклеотидов подряд [78]. Благодаря уникальным окислительно-восстановительным потенциалам, данные метки можно одновременно и радиометрически обнаруживать с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии на стеклоуглеродных электродах [78]. Это первая демонстрация концепции мультипотенциального кодирования оснований ДНК, которая позволила определить относительное содержание (соотношение) всех четырех нуклеотидных оснований в неизвестной последовательности ДНК, но количественная оценка общего количества

нуклеотидов каждого вида оставалась нерешенной задачей. В работе [103] этот вопрос был рассмотрен путем сравнения двух вариантов количественной оценки числа нуклеотидов: (1) использования внутреннего стандарта в праймере (7-дезаза-2'-дезоксигуанозина в ДНК-праймере) и (2) использования пятой электроактивной метки (модифицированного виологеном праймера), которое облегчает получение реперного аналитического сигнала, позволяющего определить точное количество каждой метки и, следовательно, каждого нуклеотидного основания, присутствующего в определенной последовательности ДНК. Эта пятая ортогональная электроактивная метка выступала в качестве точки отсчета для нормализации сигнала, что позволило провести точный электрохимический анализ последовательности за одно считывание. Оба способа были протестированы с применением различных последовательностей ДНК, и полученные вольтамперометрические сигналы нормализованы с использованием либо внутреннего стандарта (7-дезаза-2'-дезоксигуанозина), либо пятой метки (виологена). Было продемонстрировано полное соответствие фактическому составу нуклеотидов, что открывает перспективы для целенаправленного анализа последовательности ДНК [103].

АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С УЧАСТИЕМ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ МЕЧЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Амплификация нуклеиновых кислот с участием искусственных модифицированных нуклеотидов была впервые использована для синтеза функциональных нуклеиновых кислот, аптамеров и соматомеров, обладающих сродством к различным лигандам, а также флуоресцентных меченых олигонуклеотидов как альтернатива классическим методам синтеза [55]. Классическими способами получения модифицированных нуклеиновых кислот являются твердофазный синтез олигонуклеотидов с использованием фосфоамидитов функционализированных нуклеозидов и постсинтетическая модификация олигонуклеотидов [55]. Твердофазный химический синтез модифицированных олигонуклеотидов с использованием фосфоамидитов нуклеозидов, конъюгированных с дополнительными функциональными группами, часто проблематичен из-за их несовместимости с условиями определенных

стадий синтеза (кислотного детритилирования, конденсации, экпирования, окисления и удаления ацильных защитных групп с отщеплением синтезированных олигонуклеотидов от твердофазного носителя обработкой аммиаком на финальной постсинтетической стадии), необходимости использования дополнительных защитных групп и иногда низкого выхода на стадии конденсации. С другой стороны, постсинтетическая модификация олигонуклеотидов требует селективных и мягких реакций и в большинстве случаев используется только для дальнейших преобразований функциональных групп уже модифицированных олигонуклеотидов. Помимо химического синтеза, модифицированные нуклеиновые кислоты могут быть получены ферментативным путем посредством включения модифицированных нуклеозидтрифосфатов ДНК- или РНК-полимеразами [55]. Детальный экскурс в историю ферментативного синтеза функциональных нуклеиновых кислот дан в обзорах Хочека и Фойты [8, 55]. Первая работа по полимеразному включению функционализированного по азотистому основанию нуклеотида в цепь ДНК была опубликована в 1981 г. [122]: был получен дУТФ, биотинилированный в положении С5, и обнаружено, что он является субстратом для нескольких ДНК-полимераз. Позже нуклеотид дУТФ, меченный красителем FluoroRed, и нуклеотид дЦТФ, меченный родамином 110, применили для флуоресцентного мечения ДНК путем удлинения праймера с использованием экзополимеразы Klenow [123]. Далее получили дУТФ, меченные красителем TAMRA, где флуоресцентная метка прикреплена к нуклеотиду с помощью ацетиленового линкера к положению С5 урацила [124]. Затем данные модифицированные нуклеотиды были включены полимеразой TaqFS путем удлинения праймера с получением флуоресцентных конъюгатов ДНК. Саваи и др. [125] синтезировали модифицированные дУТФ, содержащие аминокислотные остатки в положении С5, и исследовали их субстратные свойства относительно ДНК-полимеразы KOD Dash в ходе ПЦР. ПЦР с внесением С5-модифицированного дУТФ, имеющего аминокислотную группу (аргинил, гистидил, лизил, фенилаланил, триптофанил, лейцил, пролил, глутаминил, серил, О-бензилсерил или треонил), дала соответствующие полноразмерные продукты ПЦР с хорошим выходом. Хотя было обнаружено, что аналоги дУТФ, содержащие аспартил, глутамил или цистеинил, являются плохими субстратами

для ДНК-полимеразы KOD Dash, оптимизация условий ПЦР привела к получению значимого количества полноразмерных продуктов. В случае реакции с использованием аналога дУТФ, имеющего цистеинильную группу, добавление восстановителя улучшало выход реакции [125]. Позже были получены несколько типов нуклеотидов, модифицированных ферроценом, привлекательных для электрохимического обнаружения, которые были включены в последовательность ДНК и использованы для решения различных биоаналитических задач [74–78, 103–106, 108, 109]. Возникает закономерный вопрос о совместимости модифицированных нуклеотидов с существующими классами различных ДНК-полимераз. К сожалению, из опубликованных исследований нельзя сделать однозначный вывод об универсальной ДНК-полимеразе. Саваи и др. [126, 127], исследуя эффективность различных ДНК-полимераз относительно включения С5-замещенных пиримидиновых дНТФ, подтвердили, что полимеразы семейства В (KOD Dash, Pwo и Vent), как правило, более эффективны, чем полимеразы семейства А. Однако для каждого нового модифицированного нуклеотида необходим скрининг нескольких полимераз, чтобы найти наиболее эффективную для конкретного нуклеотида. Совместимость искусственных электроактивных нуклеотидов с рядом ДНК-полимераз проанализирована в обзоре [55]. Из-за широкого структурного разнообразия и целого спектра биологических функций конструирование модифицированных молекул РНК даже более привлекательно, чем модификация ДНК. Нуклеозидтрифосфаты (НТФ), функционализированные по основанию, также были получены и успешно включены в цепь РНК с помощью соответствующих полимераз [55]. Биотинилированный УТФ был первым примером модифицированного НТФ, инкорпорированного РНК-полимеразой T7 [122]. Конъюгаты УТФ с ферроценом или антрахиноном были успешно встроены в цепь РНК с помощью T7 и SP6 РНК-полимераз [107].

В целом модифицированные нуклеотиды с электроактивными метками хорошо работают в формате РЕХ [82, 83, 87, 92, 98, 102, 106, 108] или присоединяются к 3'-концу ДНК-олигонуклеотида терминальной дезокси-нуклеотидил-трансферазой (англ. terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) [85, 87]. В то же время искусственные модифицированные нуклеотиды во многих случаях препятствуют амплификации

днДНК (вплоть до полной остановки реакции) за некоторыми исключениями [74, 76, 84, 85, 88, 89, 97, 108, 109, 110, 125]. Предположительно, это связано с тем, что в ходе амплификации полимеразы должна "считывать" модифицированную цепь ДНК, служащую матрицей. В целом скорость реакции амплификации снижается в присутствии искусственных модифицированных нуклеотидов [64, 74, 76, 83, 85, 97, 108]. Например, увеличение концентрации флуоресцентных меченых дУТФ-Су5 в реакционной смеси выше уровня 8% (вместо природного дТТФ) значительно снижало выход продукта ПЦР как для Taq, так и для Vent (exo-) ДНК-полимераз; оптимальный процент замещения составил 3–5% в зависимости от типа модифицированного нуклеотида и полимеразы [64]. Помимо этого, как показал собственный опыт авторов данного обзора, включение модифицированных нуклеотидов в цепь днДНК требует высокой активности фермента. Даже небольшое снижение активности фермента приводит к падению уровня встраивания модифицированных нуклеотидов в днДНК и, вероятно, служит причиной образования укороченных продуктов [110]. Интересно, что для встраивания искусственных нуклеотидов имеет значение соотношение концентраций всех нуклеотидов в реакционной смеси. Так, увеличение концентрации модифицированного антрахиноном дНТФ в десять раз по сравнению с природным дНТФ приводило к ингибированию реакции РЕХ [83].

Изучено влияние структуры модифицированных нуклеотидов на совместимость с различными полимеразными реакциями амплификации. Так, на примере дУТФ, меченных красителем Су5, показано, что в ПЦР наиболее эффективный субстрат для полимераз Taq и Vent (exo-) характеризуется электронейтральностью флуорофора и средней или большой длиной связующих звеньев между репортерной группой и пиримидиновым основанием [64]. Нуклеотиды дУТФ, меченные электронейтральными цвиттер-ионными аналогами флуорофоров Су3 или Су5, вступали в ПЦР, катализируемую Taq-полимеразой, примерно на порядок эффективнее, чем дУТФ, меченные отрицательно заряженными аналогами цианиновых красителей [65]. Введение взаимокомпенсирующих зарядов во флуорофоры или другие функциональные группы, сопряженные с нуклеотидами, можно рассматривать как основу для создания ПЦР-совместимых модифицированных нуклеотидов

[65]. Эффективность флуоресцентного мечения ДНК Таq-полимеразой в ПЦР при введении дУТФ, модифицированных аналогами красителя Су5 (2–10% замещения дТТФ в реакционной смеси), распознавание образования дуплексов ДНК зависят также от относительной ориентации красителя и линкера между красителем и пиримидиновым основанием, а также от присутствия гидрофильных групп в красителе [128]. Аналогично в реакциях РЕХ два дУТФ, меченных ферроценом и отличающихся друг от друга лишь длиной линкера, связывающего метку с нуклеотидом, показали разную совместимость с ферментами [108]. Тем не менее в недавних публикациях РЕХ и изотермическую амплификацию ДНК с модифицированными ферроценом нуклеотидами использовали для разработки диагностических платформ для выявления одонуклеотидного полиморфизма, основанных на электрохимическом детектировании сигнала меченых нуклеотидов [66, 73].

Введение в реакцию амплификации синтетических модифицированных нуклеотидов вносит в ее течение свои особенности. Показано, что присутствие модифицированного нуклеотида в реакционной смеси для амплификации обычно приводит к более низкому выходу продуктов или даже полному ингибированию реакции амплификации [8, 74, 76, 85, 90, 97, 107, 108]. Следовательно, общий выход встроенных меток, который обычно определяет чувствительность электрохимического детектирования, становится компромиссом между уровнем мечения отдельного ампликона и выходом меченых ампликонов в реакции амплификации [74, 76, 85, 90, 97, 107]. Например, модифицированный флуоресцеином или родамином дУТФ продемонстрировал значительное снижение выхода реакций амплификации ПЦР и изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА, англ. recombinase polymerase amplification, RPA) с увеличением доли нуклеотида в реакционной смеси относительно природного дТТФ при повышении уровня мечения ампликонов [90]. Другим примером включения модифицированных нуклеотидов в ПЦР является использование 5-(4-азидофенил)-2'-дезокситидин-5'-трифосфатов (дЦТФ-А3Ф), где ампликоны днДНК ожидаемого размера получены при 10–80%-ной замене дЦТФ на дЦТФ-А3Ф, в то время как при 100%-ной замене дЦТФ на дЦТФ-А3Ф полноразмерных продуктов ПЦР не наблюдалось [99]. Практически неизменный

выход ампликонов зарегистрирован вплоть до 60%-ного замещения дЦТФ на дЦТФ-А3Ф, в то время как для 80%-ной замены наблюдалось заметное снижение интенсивности полосы ампликонов на гель-электрофореграмме [97]. Ранее показано, что заметный выход продукта ПЦР может наблюдаться только при 50%-ной замене дАТФ на связанный с фенотиразином дАТФ [85]. При включении в ПРЦ дУТФ, меченных ферроценом, на гель-электрофореграмме наблюдали выход полноразмерных продуктов (длиной 998 п.о.) при 25–75%-ном замещении дТТФ на дУТФ-Fc [108].

Сегодня сформировался запрос на вывод ДНК-диагностики за стены специализированных лабораторий и проведения тестирования “на месте оказания медицинской помощи” и “в полевых условиях” в медицине, экологии и сельском хозяйстве [4, 129]. В рамках этой тенденции использование изотермической амплификации ДНК рассматривается как привлекательный подход к обнаружению инфекционных агентов *in situ*, благодаря постоянной температуре реакции, которая снижает сложность требуемого оборудования, обеспечивая при этом время и чувствительность тестирования, сравнимые с таковыми при ПЦР [2, 130–134]. Изотермическая амплификация может быть интегрирована в различные биосенсорные системы, в том числе основанные на электрохимической регистрации результата реакции [6, 7, 129]. Помимо этого, появляются новые задачи для классических методов амплификации, таких как ПЦР. Так, производные дУТФ, меченные аналогом Су5, использовали в реакции ПЦР для идентификации циркулирующих в России вариантов коронавируса SARS-CoV-2 с помощью системы ПЦР в реальном времени, основанной на праймерах, специфичных к консервативному генетическому локусу, фрагменту (при 2%-ном замещении природных дТТФ) [135]. Выбор консервативного участка Е-гена, кодирующего малый трансмембранный белок Е, в качестве мишени для обратной транскрипции с последующей амплификацией позволил выявлять коронавирус независимо от его подтипов, характеризующихся антигенной гетерогенностью в N- и S-белках [135]. Комбинация электроактивных меченых нуклеотидов с изотермической амплификацией ДНК и последующим прямым электрохимическим детектированием модифицированных ампликонов днДНК перспективна для обнаружения патогенных микроорганизмов или вирусов

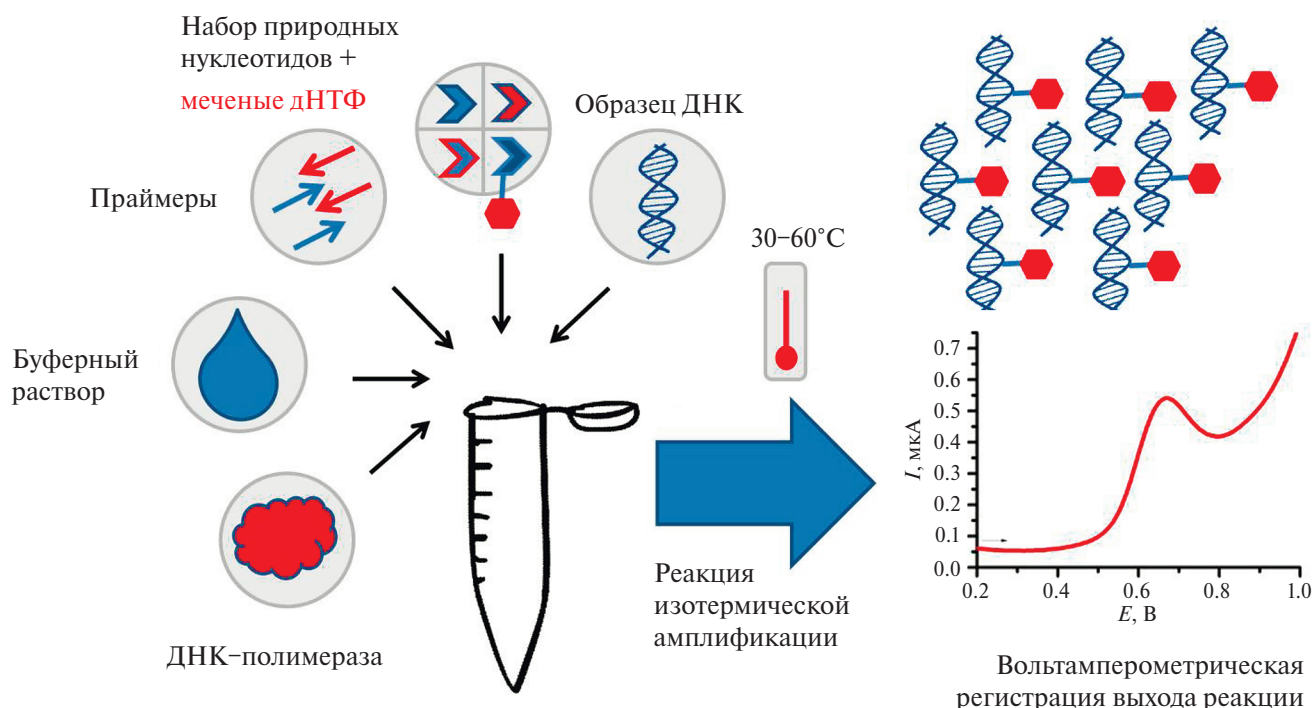


Рис. 5. Объединение реакции изотермической амплификации с внесением модифицированных нуклеотидов и вольтамперометрической регистрации выхода — путь к определению вирусного или бактериального заражения *in situ*.

в “полевых условиях” с использованием портативных и технически простых электрохимических устройств (рис. 5). Предпринято несколько попыток включить модифицированные нуклеотиды с электроактивными метками в ампликоны ДНК с помощью методов изотермической амплификации, таких как РПА [76, 89] и амплификации с использованием полимеразы и никирующего фермента (nicking enzyme amplification reaction, NEAR, в результате которой генерируются многочисленные короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, копирующие матричную последовательность) [85, 136]. Следует отметить, что в NEAR фрагменты онДНК синтезируются на немодифицированной матрице, в то время как в РПА, аналогично ПЦР, требуется полимеразы для “считывания” модифицированной цепи ДНК [76, 85, 89, 134]. На практике ферменты, используемые в РПА, более “капризны” по отношению к искусственным нуклеотидам по сравнению с ферментами, используемыми в ПЦР [89, 90]. Так, производные дУТФ, меченные остатками тирозина, были успешно включены в ампликоны онДНК с помощью РПА при 100%-ной замене дТТФ [89]. В другом случае при 100%-ной замене немодифицированного нуклеотида на модифицированный ферроце-ном на гель-электрофореграмме не наблюдалось

образования полноразмерных ампликонов [76]. Предположительно, существует зависимость скорости и выхода реакций амплификации ДНК в присутствии искусственных модифицированных нуклеотидов от последовательности образующегося ампликона. Флуоресцентно меченные дУТФ и дЦТФ, содержащие цвиттер-ионный индодикарбоцианиновый краситель, аналог Су5, показали хорошую совместимость с РПА, дав полноразмерные целевые продукты фрагмента гена *ebpS* возбудителя бактериальной пневмонии (*Staphylococcus aureus*) с высокой плотностью флуоресцентной метки (при 4%-ном замещении соответствующих природных нуклеотидов в реакционной смеси) [137]. Кроме того, электроактивные модифицированные нуклеотиды использовали для детектирования белков (например, белка p53) [100], создания геносенсоров [74] и выявления однонуклеотидных полиморфизмов [73, 76, 77, 106], ассоциированных с различными заболеваниями (рис. 3).

* * *

Обнаружение и идентификация нуклеиновых кислот — одно из центральных направлений современной биологической химии. Ферменты, модифицирующие нуклеиновые кислоты, такие как полимеразы, лигазы и нуклеазы,

используемые в генотипировании, пока не нашли широкого применения в электрохимических методах анализа. Таким образом, необходимо прилагать дополнительные усилия для более тесной интеграции электрохимии и молекулярной биологии. Электрохимические методы, обладающие высокой чувствительностью, низкими затратами на оборудование, возможностью миниатюризации и прямым электронным считыванием, являются привлекательной альтернативой общепринятым методам обнаружения нуклеиновых кислот, основанным на колориметрии или турбидиметрии. Хотя регистрация сигнала электроактивных нуклеиновых кислот может быть достигнута с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии или капиллярного электрофореза в сочетании с электрохимическим детектором, эти методы не подходят для миниатюризации анализа. Из известных электрохимических подходов маркировка электроактивными фрагментами обладает совокупными преимуществами: положительным сигналом обнаружения, низким фоном и возможностью введения нескольких электрохимически различимых меток. Современное развитие ДНК-технологий открывает все новые области применения синтетических модифицированных нуклеотидов, несущих электроактивные фрагменты, включая разработку портативных анализаторов для обнаружения патогенных микроорганизмов и вирусов *in situ*, электрохимических подходов к генотипированию, систем для анализа экспрессии генов, секвенирования нуклеиновых кислот, методов определения гибридизации и повреждения нуклеиновых кислот, а также регистрации взаимодействий ДНК–белок. Разработка, синтез и проверка производных нуклеотидов на электрохимическую активность и в качестве субстратов ДНК- и РНК-полимераз – новое направление на стыке органической, биологической и аналитической химии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-14-00247, <https://rscf.ru/project/19-14-00247/>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahanama A., Wilson-Davies E. Insight into PCR testing for surgeons // *Surgery (Oxford)*. 2021. V. 39. № 11. P. 759. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.09.016>
2. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 22. P. 12491. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
3. De Felice M., De Falco M., Zappi D., Antonacci A., Scognamiglio V. Isothermal amplification-assisted diagnostics for COVID-19 // *Biosens. Bioelectron.* 2022. V. 205. Article 114101. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114101>
4. Wang C., Liu M., Wang Z., Li S., Deng Y., He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices // *Nano Today* 2021. V. 37. Article 101092. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101092>
5. Mukama O., Nie C., de Dieu Habimana J., Meng X., Ting Y., Songwe F. et al. Synergetic performance of isothermal amplification techniques and lateral flow approach for nucleic acid diagnostics // *Anal. Biochem.* 2020. V. 600. Article 113762. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113762>
6. Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. Isothermal exponential amplification techniques: From basic principles to applications in electrochemical biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 110. P. 207. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.065>
7. Trotter M., Borst N., Thewes R., von Stetten F. Electrochemical DNA sensing – Principles, commercial systems, and applications // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 154. Article 112069. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112069>
8. Hock M., Fojta M. Nucleobase modification as redox DNA labelling for electrochemical detection // *Chem. Soc. Rev.* 2011. V. 40. P. 5802. <https://doi.org/10.1039/C1CS15049A>
9. Fojta M. Redox Labeling of nucleic acids for electrochemical analysis of nucleotide sequences and DNA damage / *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications* / Eds. D.P. Nikolelis, G.-P. Nikoleli. New York: Springer, 2016. P. 309.
10. Супрун Е.В., Будников Г.К. Биоэлектрохимия как область анализа: исторические аспекты и современное состояние // *Журн. аналит. химии*. 2022. Т. 77. № 6. С. 490. <https://doi.org/10.31857/S0044450222060184> (*Suprun E.V., Budnikov H.C. Bioelectrochemistry as a Field of Analysis: Historical Aspects and Current Status* // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 6. P. 643. <https://doi.org/10.1134/S1061934822060168>)
11. de-los-Santos-Álvarez P., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tunon-Blanco P. Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications // *Electroanalysis*. 2004. V. 16. P. 1193. <https://doi.org/10.1002/elan.200402995>

12. *Diculescu V.C., Chiorcea-Paquim A.M., Oliveira-Brett A.M.* Applications of a DNA-electrochemical biosensor // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 79. P. 23. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.019>
13. *Fojta M., Daňhel A., Havran L., Vyskočil V.* Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 79. P. 160. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.018>
14. *Ferapontova E.E.* DNA electrochemistry and electrochemical sensors for nucleic acids // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2018. V. 11. P. 197. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-125811>
15. *Oliveira S.C.B., Oliveira-Brett A.M.* Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine // *J. Electroanal. Chem.* 2010. V. 648. P. 60. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.06.020>
16. *Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzková-Pecková K.* Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1077. P. 30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.041>
17. *Hason S., Danhel A., Schwarzková-Pecková K., Fojta M.* Carbon electrodes in electrochemical analysis of biomolecules and bioactive substances: Roles of surface structures and chemical groups / *Nanotechnology and Biosensors* / Eds. D.P. Nikolelis, G.-P. Nikoleli. Amsterdam, Oxford, Cambridge: Elsevier, 2018. P. 51.
18. *Oliveira Brett A.M., Matysik F.M.* Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode // *J. Electroanal. Chem.* 1997. V. 429. P. 95. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(96\)05018-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(96)05018-8)
19. *Oliveira-Brett A.M., Piedade J.A.P., Silva L.D., Diculescu V.C.* Voltammetric determination of all DNA nucleotides // *Anal. Biochem.* 2004. V. 332. P. 321. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.021>
20. *Ferapontova E.E.* Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes // *Electrochim. Acta.* 2004. V. 49. P. 1751. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2003.12.006>
21. *Oliveira-Brett A.M.* Electrochemical DNA assays / *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* / Ed. P.N. Barlett. John Wiley & Sons, 2008. P. 411.
22. *Špaček J., Daňhel A., Hason S., Fojta M.* Label-free detection of canonical DNA bases, uracil and 5-methylcytosine in DNA oligonucleotides using linear sweep voltammetry at a pyrolytic graphite electrode // *Electrochem. Commun.* 2017. V. 82. P. 34. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.07.013>
23. *Stempkowska I., Ligaj M., Jasnowska J., Langer J., Filipiak M.* Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode // *Bioelectrochemistry.* 2007. V. 70. P. 488. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.07.012>
24. *Dryhurst G., Elving P.J.* Electrochemical oxidation of adenine: Reaction products and mechanisms // *J. Electrochem. Soc.* 1968. V. 115. P. 1014. <https://doi.org/10.1149/1.2410847>
25. *Dryhurst G., Pace G.F.* Electrochemical oxidation of guanine at the pyrolytic graphite electrode // *J. Electrochem. Soc.* 1970. V. 117. P. 1259. <https://doi.org/10.1149/1.2407283>
26. *Goncalves L.M., Batchelor-McAuley C., Barros A.A., Compton R.G.* Electrochemical oxidation of adenine: a mixed adsorption and diffusion response on an edge-plane pyrolytic graphite electrode // *J. Phys. Chem. C* 2010. V. 114. № 33. P. 14213. <https://doi.org/10.1021/jp1046672>
27. *Li Q., Batchelor-McAuley C., Compton R.G.* Electrochemical oxidation of guanine: Electrode reaction mechanism and tailoring carbon electrode surfaces to switch between adsorptive and diffusional responses // *J. Phys. Chem. B* 2010. V. 114. № 21. P. 7423. <https://doi.org/10.1021/jp1021196>
28. *Dryhurst G.* Electrochemical determination of adenine and adenosine: Adsorption of adenine and adenosine at the pyrolytic graphite electrode // *Talanta.* 1972. V. 19. P. 769. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(72\)80004-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(72)80004-3)
29. *Dryhurst G.* Adsorption of guanine and guanosine at the pyrolytic graphite electrode: Implications for the determination of guanine in the presence of guanosine // *Anal. Chim. Acta.* 1971. V. 57. P. 137. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80138-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80138-0)
30. *Hason S., Fojta M., Ostatná V.* Label-free electrochemical analysis of purine nucleotides and nucleobases at disposable carbon electrodes in microliter volumes // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 847. Article 113252. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113252>
31. *de-los-Santos-Álvarez N., de-los-Santos-Álvarez P., Jesús Lobo-Castañón M., López R., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco P.* Electrochemical oxidation of guanosine and adenosine: Two convergent pathways // *Electrochem. Commun.* 2007. V. 9. № 8. P. 1862. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.04.018>
32. *Goyal R.N., Sangal A.* Electrochemical oxidation of adenosine monophosphate at a pyrolytic graphite electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2003. V. 557. P. 147. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(03\)00367-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(03)00367-X)
33. *Goyal R.N., Singh U.P., Abdullah A.A.* Electrochemical oxidation of uracil and 5-halouracils at pyrolytic graphite electrode // *Indian J. Chem.* 2003. V. 42A. P. 42. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/20491>
34. *Brotons A., Vidal-Iglesias F.J., Solla-Gullón J., Iniesta J.* Carbon materials for the electrooxidation of nucleobases, nucleosides and nucleotides toward cytosine methylation detection: A review // *Anal. Methods.* 2016. V. 8. P. 702. <https://doi.org/10.1039/C5AY02616D>

35. *Brotons A., Mas L.A., Metters J.P., Banks C.E., Iniesta J.* Voltammetric behaviour of free DNA bases, methylcytosine and oligonucleotides at disposable screen printed graphite electrode platforms // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 5239.
<https://doi.org/10.1039/c3an02050a>
36. *Vidláková P., Pivoňková H., Kejnovská I., Trnková L., Vorlíčková M., Fojta M., Havran L.* G-quadruplex-based structural transitions in 15-mer DNA oligonucleotides varying in lengths of internal oligo(dG) stretches detected by voltammetric techniques // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 5817.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8768-1>
37. *Brotons A., Sanjuán I., Foster C.W., Banks C.E., Vidal-Iglesias F.J., Solla-Gullón J., Iniesta J.* A facile and cost-effective electroanalytical strategy for the quantification of deoxyguanosine and deoxyadenosine in oligonucleotides using screen-printed graphite electrodes // *Electroanalysis*. 2016. V. 28. P. 3066.
<https://doi.org/10.1002/elan.201600272>
38. *Suprun E.V., Kutdusova G.R., Khmeleva S.A., Ptitsyn K.G., Kurbatov L.K., Radko S.P.* Voltammetric oxidation behavior of single-stranded DNA on carbon screen printed electrodes: From short oligonucleotides to ultralong amplification products // *Microchem. J.* 2023. V. 191. Article 108800.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108800>
39. *Chiorcea-Paquim A.M., Oliveira-Brett A.M.* Redox behaviour of G-quadruplexes // *Electrochim. Acta*. 2014. V. 126. P. 162.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.150>
40. *Rodrigues Pontinha A.D., Chiorcea-Paquim A.M., Eritja R., Oliveira-Brett A.M.* Quadruplex nanostructures of d(TGGGGT): Influence of sodium and potassium ions // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 5851.
<https://doi.org/10.1021/ac500624z>
41. *Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S.* The structure and function of DNA G-quadruplexes // *Trends Chem.* 2020. V. 2. № 2. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.07.002>
42. *Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A. et al.* Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. № 10. P. 3324.
<https://doi.org/10.1039/C3CS60439J>
43. *Tang J., Liang A., Yao C., Yang D.* Assembly of rolling circle amplification-produced ultralong single-stranded DNA to construct biofunctional DNA materials // *Chem. Eur. J.* 2023. V. 29. Article e202202673.
<https://doi.org/10.1002/chem.202202673>
44. *Brabec V.* Study of thermal and acid denaturation of DNA by means of voltammetry at graphite electrodes // *Biopolymers*. 1979. V. 18. P. 2397.
<https://doi.org/10.1002/bip.1979.360181003>
45. *Brabec V.* 314 – Electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode. Qualitative aspects // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1980. V. 7. P. 69.
[https://doi.org/10.1016/0302-4598\(80\)87033-4](https://doi.org/10.1016/0302-4598(80)87033-4)
46. *Brabec V., Koudelka J.* 394 – Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1980. V. 116. P. 793.
[https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80307-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80307-X)
47. *Brabec V.* Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1981. V. 128. P. 437.
[https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(81\)80236-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(81)80236-7)
48. *Ferapontova E.E., Domínguez E.* Direct electrochemical oxidation of DNA on polycrystalline gold electrodes // *Electroanalysis*. 2003. V. 15. P. 629.
<https://doi.org/10.1002/elan.200390079>
49. *Oliveira Brett A.M., Serrano S.H.P.* The electrochemical oxidation of DNA // *J. Braz. Chem. Soc.* 1995. V. 6. P. 97.
50. *Honeychurch K.C., O'Donovan M.R., Hart J.P.* Voltammetric behaviour of DNA bases at a screen-printed carbon electrode and its application to a simple and rapid voltammetric method for the determination of oxidative damage in double stranded DNA // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. P. 2057.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.019>
51. *Brabec V.* Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces: VI. A comparative study on the electrochemical behaviour of native and denatured DNAs at graphite electrodes // *Biophys. Chem.* 1979. V. 9. P. 289.
[https://doi.org/10.1016/0301-4622\(75\)80045-7](https://doi.org/10.1016/0301-4622(75)80045-7)
52. *Brett C.M.A., Oliveira Brett A.M., Serrano S.H.* On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 1994. V. 366. P. 225.
[https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)02994-S](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)02994-S)
53. *Suprun E.V., Kutdusova G.R., Khmeleva S.A., Radko S.P.* Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 124. Article 106947.
<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.106947>
54. *Suprun E.V.* Direct electrochemistry of proteins and nucleic acids: The focus on 3D structure // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 125. Article 106983.
<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.106983>
55. *Hocek M., Fojta M.* Cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by polymerase incorporation. Construction and applications of base-functionalized nucleic acids // *Org. Biomol. Chem.* 2008. V. 6. № 13. P. 2233.
<https://doi.org/10.1039/B803664K>
56. *Wagner C., Wagenknecht H.A.* Reductive electron transfer in phenothiazine-modified DNA is dependent on the base sequence // *Chem. Eur. J.* 2005. V. 11. № 6. P. 1871.
<https://doi.org/10.1002/chem.200401013>
57. *Fendt L.A., Bouamaied I., Thöni S., Amiot N., Stulz E.* DNA as supramolecular scaffold for porphyrin arrays on the nanometer scale // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 49. P. 15319.
<https://doi.org/10.1021/ja075711c>
58. *Hurley D.J., Tor Y.* Metal-containing oligonucleotides: Solid-phase synthesis and luminescence properties // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. № 9. P. 2194.
<https://doi.org/10.1021/ja9739998>

59. Hurley D.J., Tor Y. Donor/acceptor interactions in systematically modified RuII–OsII oligonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 44. P. 13231. <https://doi.org/10.1021/ja020172r>
60. Hurley, D.J., Tor Y. Ru (II) and Os (II) nucleosides and oligonucleotides: Synthesis and properties // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 14. P. 3749. <https://doi.org/10.1021/ja0123103>
61. Hurley D.J., Seaman S.E., Mazura J.C., Tor Y. Fluorescent 1,10-phenanthroline-containing oligonucleotides distinguish between perfect and mismatched base pairing // *Org. Lett.* 2002. V. 4. № 14. P. 2305. <https://doi.org/10.1021/ol026043x>
62. Walton T.A., Lyttle, M.H., Dick, D.J., Cook R.M. Evaluation of new linkers and synthetic methods for internal modified oligonucleotides // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. № 5. P. 1155. <https://doi.org/10.1021/bc0200125>
63. Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Guseinov T.O., Fesenko E.E., Lapa S.A. et al. Novel fluorescently labeled nucleotides: Synthesis, spectral properties and application in polymerase chain reaction // *Mendeleev Commun.* 2016. V. 2. № 26. P. 95. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2016.03.002>
64. Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A. et al. Comparative study of novel fluorescent cyanine nucleotides: Hybridization analysis of labeled PCR products using a biochip // *J. Fluoresc.* 2017. V. 27. P. 2001. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2139-6>
65. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O. et al. dUTPs conjugated with zwitterionic Cy3 or Cy5 fluorophore analogues are effective substrates for DNA amplification and labelling by Taq polymerase // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № 12. Article e73. <https://doi.org/10.1093/nar/gky247>
66. Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Miftakhov R.A., Sol'yev P.N., Novikov R.A. et al. Synthesis of Cy5-labelled C5-alkynyl-modified cytidine triphosphates via Sonogashira coupling for DNA labelling // *Bioorg. Chem.* 2023. V. 131. Article 106315. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106315>
67. Hunziker J. Synthesis of 5-(2-amino-2-deoxy- β -d-glucopyranosyloxymethyl)-2'-deoxyuridine and its incorporation into oligothymidylates // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 1999. V. 9. № 2. P. 201. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00700-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00700-8)
68. Matsuura K., Hibino M., Ikeda T., Yamada Y., Kobayashi K. Self-organized glycoclusters along DNA: Effect of the spatial arrangement of galactoside residues on cooperative lectin recognition // *Chem. Eur. J.* 2004. V. 10. № 2. P. 352. <https://doi.org/10.1002/chem.200305465>
69. Лана С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О. и др. Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей // *Молекулярная биология.* 2018. Т. 52. № 6. С. 984. (Lapa S.A., Romashova K.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedateleva O.A., Radko S.P., Timofeev E.N., Lisitsa A.V., Chudinov A.V. et al. Preparation of modified combinatorial DNA libraries via emulsion PCR with subsequent strand separation // *Mol. Biol.* 2018. V. 52. № 6. P. 854. <https://doi.org/10.1134/S0026893318060110>)
70. Чудинов А.В., Киселева Я.Ю., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О. и др. Ферментативный синтез ДНК с высокой степенью модификации // *Молекулярная биология.* 2017. Т. 51. № 3. С. 534. (Chudinov A.V., Kiseleva Y.Y., Kuznetsov V.E., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O. et al. Structural and functional analysis of biopolymers and their complexes: enzymatic synthesis of high-modified DNA // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. № 3. P. 474. <https://doi.org/10.1134/S0026893317030025>)
71. Zasedateleva O.A., Surzhikov S.A., Shershov V.E., Miftakhov R.A., Yurasov D.A., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V. PCR incorporation of dUMPs modified with aromatic hydrocarbon substituents of different hydrophilicities: Synthesis of C5-modified dUTPs and PCR studies using Taq, Tth, Vent (exo-) and Deep Vent (exo-) polymerases // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 99. Article 103829. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103829>
72. Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. The toolbox for modified aptamers // *Mol. Biotechnol.* 2016. V. 58. № 2. P. 79. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9907-9>
73. Debelá A.M., Thorimbert S., Hasenknopf B., O'Sullivan C.K., Ortiz M. Electrochemical primer extension for the detection of single nucleotide polymorphisms in the cardiomyopathy associated MYH7 gene // *Chem. Commun.* 2016. V. 52. P. 757. <https://doi.org/10.1039/C5CC07762A>
74. Magriñá I., Toldrà A., Campàs M., Ortiz M., Simonova A., Katakis I., Hocek M. et al. Electrochemical genosensor for the direct detection of tailed PCR amplicons incorporating ferrocene labelled dATP // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 134. P. 76. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.060>
- Simonova A., Magriñá I., Sýkorová V., Pohl R., Ortiz M., Havran L., et al. Tuning of oxidation potential of ferrocene for ratiometric redox labeling and coding of nucleotides and DNA // *Chem. Eur. J.* 2020. V. 26. P. 1286. <https://doi.org/10.1002/chem.201904700>
75. Ortiz M., Jauset-Rubio M., Kodr D., Simonova A., Hocek M., O'Sullivan C.K. Solid-phase recombinase polymerase amplification using ferrocene-labelled dNTPs for electrochemical detection of single nucleotide polymorphisms // *Biosens. Bioelectron.* 2022. V. 198. Article 113825. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113825>
76. Ortiz M., Jauset-Rubio M., Trummer O., Foessel I., Kodr D., Acero J.L. et al. Generic platform for the multiplexed targeted electrochemical detection of

- osteoporosis-associated single nucleotide polymorphisms using recombinase polymerase solid-phase primer elongation and ferrocene-modified nucleoside triphosphates // *ACS Cent. Sci.* 2023. V. 9. P. 1591. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00243>
77. Kodr D., Yenice C.P., Simonova A., Pavlović Saftić D., Pohl R., Sýkorová V., Ortiz M., Havran L., Fojta M., Lesnikowski Z.J., O'Sullivan C.K., Hocek M. Carborane- or metallacarborane-linked nucleotides for redox labeling. orthogonal multipotential coding of all four DNA bases for electrochemical analysis and sequencing // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. V. 143. P. 7124. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c02222>
 78. Havranová-Vidláková P., Krömer M., Sýkorová V., Trefulka M., Fojta M., Havran L., Hocek M. Vicinal diol-tethered nucleobases as targets for DNA redox labeling with osmate complexes // *ChemBioChem.* 2020. V. 21. P. 171. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900388>
 79. Debela A.M., Ortiz M., Beni V., Thorimbert S., Lesage D., Cole R.B. et al. Biofunctionalization of polyoxometalates with DNA primers, their use in the polymerase chain reaction (PCR) and electrochemical detection of PCR products // *Chem. Eur. J.* 2015. V. 21. № 49. P. 17721. <https://doi.org/10.1002/chem.201502247>
 80. Ortiz M., Debela A.M., Svobodova M., Thorimbert S., Lesage D., Cole R.B. et al. PCR incorporation of polyoxometalate modified deoxynucleotide triphosphates and their application in molecular electrochemical sensing of yersinia pestis // *Chem. Eur. J.* 2017. V. 23. № 44. P. 10597. <https://doi.org/10.1002/chem.201701295>
 81. Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M. Aminophenyl- and nitrophenyl-labeled nucleoside triphosphates: Synthesis, enzymatic incorporation, and electrochemical detection // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 2059. <https://doi.org/10.1002/anie.200705088>
 82. Balintová J., Pohl R., Horáková P., Vidláková P., Havran L., Fojta M., Hocek M. Anthraquinone as a Redox Label for DNA: Synthesis, enzymatic incorporation, and electrochemistry of anthraquinone-modified nucleosides, nucleotides, and DNA // *Chem. Eur. J.* 2011. V. 17. P. 14063. <https://doi.org/10.1002/chem.201101883>
 83. Simonova A., Balintová J., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M. Methoxyphenol and dihydrobenzofuran as oxidizable labels for electrochemical detection of DNA // *ChemPlusChem.* 2014. V. 79. P. 1703. <https://doi.org/10.1002/cplu.201402194>
 84. Simonova A., Havran L., Pohl R., Fojta M., Hocek M. Phenothiazine-linked nucleosides and nucleotides for redox labelling of DNA // *Org. Biomol. Chem.* 2017. V. 15. P. 6984. <https://doi.org/10.1039/C7OB01439B>
 85. Vosáhllová J., Koláčná L., Daňhel A., Fischer J., Balintová J., Hocek M. et al. Voltammetric and adsorption study of 4-nitrophenyl-triazole-labeled 2'-deoxycytidine and 7-deazaadenosine nucleosides at boron-doped diamond electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 821. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.01.003>
 86. Horáková P., Macíčková-Cahová H., Pivoňková H., Špaček J., Havran L., Hocek M., Fojta M. Tail-labelling of DNA probes using modified deoxynucleotide triphosphates and terminal deoxynucleotidyl transferase. Application in electrochemical DNA hybridization and protein-DNA binding assays // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. P. 1366. <https://doi.org/10.1039/C0OB00856G>
 87. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Kutdusova G.R., Duskaev I.F., Kuznetsova V.E., Lapa S.A. et al. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine or tryptophan aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA // *Electrochim. Acta.* 2020. V. 362. Article 137105. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137105>
 88. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Kutdusova G.R., Ptit-syn K.G., Kuznetsova V.E., Lapa S.A., Chudinov A.V., Radko S.P. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA products of isothermal recombinase polymerase amplification // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 131. Article 107120. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107120>
 89. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Bibik K.V., Ptit-syn K.G., Kurbatov L.K., Radko S.P. Polymerase incorporation of fluorescein or rhodamine modified 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates into double-stranded DNA for direct electrochemical detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2023. V. 236. Article 115737. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115737>
 90. Vidláková P., Pivoňková H., Fojta M., Havran L. Electrochemical behavior of anthraquinone- and nitrophenyl-labeled deoxynucleoside triphosphates: A contribution to development of multipotential redox labeling of DNA // *Monatsh. Chem.* 2015. V. 146. P. 839. <https://doi.org/10.1007/s00706-015-1435-6>
 91. Raindllová V., Pohl R., Klepetářová B., Havran L., Šimková E., Horáková P. et al. Synthesis of hydrazone-modified nucleotides and their polymerase incorporation onto DNA for redox labeling // *ChemPlusChem.* 2012. V. 77. P. 652. <https://doi.org/10.1002/cplu.201200056>
 92. Pheeney C.G., Guerra L.F., Barton J.K. DNA sensing by electrocatalysis with hemoglobin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. № 29. P. 11528. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201551109>
 93. Gorodetsky A.A., Green O., Yavin E., Barton J.K. Coupling into the base pair stack is necessary for DNA-mediated electrochemistry // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. № 5. P. 1434. <https://doi.org/10.1021/bc0700483>
 94. Gorodetsky A.A., Hammond W.J., Hill M.G., Slowinski K., Barton, J.K. Scanning electrochemical microscopy of DNA monolayers modified with Nile Blue // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 24. P. 14282. <https://doi.org/10.1021/la8029243>

95. Dudová Z., Špaček J., Tomaško M., Havran L., Pivoňková H., Fojta M. Electrochemical behavior of 7-deazaguanine-and 7-deazaadenine-modified DNA at the hanging mercury drop electrode // *Monatsh. Chem.* 2016. V. 147. P. 3.
<https://doi.org/10.1007/s00706-015-1584-7>
96. Danhel A., Trosanova Z., Balintova J., Havran L., Hocek M., Barek J., Fojta M. Voltammetric analysis of 5-(4-Azidophenyl)-2'-deoxycytidine nucleoside and azidophenyl-labelled single- and double-stranded DNAs // *Electrochim. Acta.* 2016. V. 215. P. 72.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.08.096>
97. Balintová J., Plucnara M., Vidláková P., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M. Benzofurazane as a new redox label for electrochemical detection of DNA: towards multipotential redox coding of DNA bases // *Chem. Eur. J.* 2013. V. 19. № 38. P. 12720.
<https://doi.org/10.1002/chem.201301868>
98. Ménová P., Cahová H., Plucnara M., Havran L., Fojta M., Hocek M. Polymerase synthesis of oligonucleotides containing a single chemically modified nucleobase for site-specific redox labelling // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 4652.
<https://doi.org/10.1039/C3CC41438H>
99. Hermanová M., Orság P., Balintová J., Hocek M., Fojta M. Dual redox labeling of DNA as a tool for electrochemical detection of p53 protein-DNA interactions // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1050. P. 123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.053>
100. Daňhel A., Trošánová Z., Balintová J., Simonová A., Pospíšil L., Cvačka J. et al. Electrochemical reduction of azidophenyl-deoxynucleoside conjugates at mercury surface // *Electrochim. Acta.* 2018. V. 259. P. 377.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.10.128>
101. Danhel A., Raindlova V., Havran L., Barek J., Hocek M., Fojta M. Voltammetric study of dsDNA modified by multi-redox label based on N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 129. P. 348.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.02.137>
102. Kodr D., Ortiz M., Sýkorová V., Yenice C.P., Lesnikowski Z.J., O'Sullivan C.K., Hocek M. Normalized multipotential redox coding of DNA bases for determination of total nucleotide composition // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. № 34. P. 12586.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02023>
103. Brázdilová P., Vrábel M., Pohl R., Pivoňková H., Havran L., Hocek M., Fojta M. Ferrocenylethynyl derivatives of nucleoside triphosphates: synthesis, incorporation, electrochemistry, and bioanalytical applications // *Chem. Eur. J.* 2007. V. 13. P. 9527.
<https://doi.org/10.1002/chem.200701249>
104. Ortiz M., Jauset-Rubio M., Skouridou V., Machado D., Viveiros M., Clark T.G. et al. Electrochemical detection of single-nucleotide polymorphism associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using solid-phase primer elongation with ferrocene-linked redox-labeled nucleotides // *ACS Sensors.* 2021. V. 6. P. 4398.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.1c01710>
105. Di Giusto D.A., Wlassoff W.A., Giesebrecht S., Gooding J.J., King G.C. Multipotential electrochemical detection of primer extension reactions on DNA self-assembled monolayers // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. No. 13. P. 4120.
<https://doi.org/10.1021/ja0319036>
106. Di Giusto D.A., Wlassoff W.A., Giesebrecht S., Gooding J.J., King G.C. Enzymatic synthesis of redox-labeled RNA and dual-potential detection at DNA-modified electrodes // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. P. 2809.
<https://doi.org/10.1002/anie.200352977>
107. Wlassoff W.A., King G.C. Ferrocene conjugates of dUTP for enzymatic redox labelling of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. Article e58.
<https://doi.org/10.1093/nar/gnf058>
108. Yeung S.S., Lee T.M., Hsing I.M. Electrochemical real-time polymerase chain reaction // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 13374.
<https://doi.org/10.1021/ja065733j>
109. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Duskaev I.F., Kurbatov L.K., Kuznetsova V.E., Shershov V.E. et al. Polymerase incorporation of 4-nitrophenyl modified 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates into double-stranded DNA for direct electrochemical detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2024. V. 241. Article 115977.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.115977>
110. Zahran M. Conducting dyes as electro-active monomers and polymers for detecting analytes in biological and environmental samples // *Heliyon.* 2023. V. 9. № 9. Article e19943.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19943>
111. Weinberg N.L., Weinberg H.R. Electrochemical oxidation of organic compounds // *Chem. Rev.* 1968. V. 68. № 4. P. 449.
<https://doi.org/10.1021/cr60254a003>
112. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds // *Electroanalysis.* 2011. V. 23. № 6. P. 1337.
<https://doi.org/10.1002/elan.201000671>
113. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways // *J. Electroanal. Chem.* 2011. V. 655. № 1. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>
114. Suprun E.V., Shumyantseva, V.V., Archakov A.I. Protein electrochemistry: application in medicine. A review // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 140. P. 72.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.089>
115. Smyth M.R., Smyth W.F. Voltammetric methods for the determination of foreign organic compounds of biological significance. A review // *Analyst.* 1978. V. 103. P. 529.
<https://doi.org/10.1039/AN9780300529>
116. Zuman P., Fijalek Z., Dumanovic D., Sužnjević D. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds, part I:

- General mechanistic aspects // *Electroanalysis*. 1992. V. 4. P. 783.
<https://doi.org/10.1002/elan.1140040808>
117. Laviron E., Vallat A., Meunier-Prest R. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium: Part V. The reduction of nitrosobenzene between pH 0.4 and 13 // *J. Electroanal. Chem.* 1994. V. 379. P. 427.
[https://doi.org/10.1016/0022-0728\(94\)87167-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(94)87167-1)
 118. Shikata M. The electrolysis of nitrobenzene with the mercury dropping cathode // *Trans. Faraday Soc.* 1925. V. 21. P. 42.
<https://doi.org/10.1039/TF9252100042>
 119. Magrina I., Ortiz M., Simonova A., Hocke M., O'Sullivan C.K., Forster R.J. Ferrocene-containing DNA monolayers: Influence of electrostatics on the electron transfer dynamics // *Langmuir*. 2021. V. 37. № 11. P. 3359.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c03485>
 120. Batterjee S.M., Marzouk M.I., Azab M.E., El-Hasshash M.A. The electrochemistry of some ferrocene derivatives: redox potential and substituent effects // *Appl. Organomet. Chem.* 2003. V. 1. No. 5. P. 291.
<https://doi.org/10.1002/aoc.414>
 121. Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981. V. 78. № 11. P. 6633.
<https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.663>
 122. Brakmann S., Löbermann S. High-density labeling of DNA: Preparation and characterization of the target material for single-molecule sequencing // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. V. 40. № 8. P. 1427. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010417\)40:8<1427::AID-ANIE1427>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010417)40:8<1427::AID-ANIE1427>3.0.CO;2-T)
 123. Thoresen L.H., Jiao G.S., Haaland W.C., Metzker M.L., Burgess K. Rigid, conjugated, fluoresceinated thymidine triphosphates: syntheses and polymerase mediated incorporation into DNA analogues // *Chem. Eur. J.* 2003. V. 9. № 19. P. 4603.
<https://doi.org/10.1002/chem.200304944>
 124. Kuwahara M., Hanawa K., Ohsawa K., Kitagata R., Ozaki H., Sawai H. Direct PCR amplification of various modified DNAs having amino acids: Convenient preparation of DNA libraries with high-potential activities for *in vitro* selection // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. V. 14. № 8. P. 2518.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.11.030>
 125. Sawai H., Nagashima J., Kuwahara M., Kitagata R., Tamura T., Matsui I. Differences in substrate specificity of C (5)-substituted or C (5)-unsubstituted pyrimidine nucleotides by DNA polymerases from thermophilic bacteria, archaea, and phages // *Chem. Biodiversity*. 2007. V. 4. P. 1979.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200790165>
 126. Sawai H., Ozaki-Nakamura A., Mine M., Ozaki H. Synthesis of new modified DNAs by hyperthermophilic DNA polymerase: Substrate and template specificity of functionalized thymidine analogues bearing an sp³-hybridized carbon at the C5 α -position for several DNA polymerases // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. P. 309.
<https://doi.org/10.1021/bc010088l>
 127. Иконникова А.Ю., Лисица Т.С., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Фесенко Д.О. и др. Влияние строения флуоресцентно-меченных производных нуклеотидов на эффективность их встраивания в ДНК в ходе полимеразной цепной реакции // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 6. С. 1093. (Ikonnikova A.Y., Lisitsa T.S., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Fesenko D.O. et al. The effect of the structure of fluorescently labeled nucleotide derivatives on the efficiency of their incorporation in DNA in the polymerase chain reaction // *Biophysics*. 2017. V. 62. P. 900.
<https://doi.org/10.1134/S0006350917060082>)
 128. Ortiz D.A., Loeffelholz M.J. Practical challenges of point-of-care testing // *Clin. Lab. Med.* 2023. V. 43. P. 155.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2023.02.002>
 129. De Falco M., De Felice M., Rota F., Zappi D., Antonacci A., Scognamiglio V. Next-generation diagnostics: Augmented sensitivity in amplification-powered biosensing // *Trends Anal. Chem.* 2022. V. 148. Article 116538.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116538>
 130. Li J., Macdonald J. Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 64. P. 196. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>
 131. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 98. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
 132. Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе // *Биохимия*. 2020. Т. 85. № 2. С. 174. <https://doi.org/10.31857/S0320972520020037> (Bodulev O.L., Sakharov I.Y. Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis // *Biochemistry (Mosc)*. 2020. V. 85. P. 147.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920020030>)
 133. Mayboroda O., Katakis I., O'Sullivan C.K. Multiplexed isothermal nucleic acid amplification // *Anal. Biochem.* 2018. V. 545. P. 20.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.005>
 134. Лана С.А., Шингарева А.А., Файзулов Е.Б., Ам-мур Ю.И., Шершов В.Е., Чудинов А.В. Видовая идентификация коронавируса SARS-CoV-2 по консервативному участку E-гена // *Биоорганическая химия*. 2023. Т. 49. № 5. С. 543. (Lapa S.A., Shingareva A.A., Faizuloev E.B., Ammour Y.I., Shershov V.E., Chudinov A.V. Species-level identification of SARS-CoV-2 by an E gene conservative site // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 912.
<https://doi.org/10.1134/S1068162023040131>)
 135. Měnová P., Ráindlová V., Hocke M. Scope and limitations of the nicking enzyme amplification reaction for the synthesis of base-modified oligonucleotides

- and primers for PCR // *Bioconjug. Chem.* 2013. V. 24. P. 1081.
<https://doi.org/10.1021/bc400149q>
136. Шершов В.Е., Лапа С.А., Левашова А.И., Шишкин И.Ю., Штылев Г.Ф., Шекалова Е.Ю. и др. Синтез флуоресцентно-меченых нуклеотидов для маркирования продуктов изотермической амплификации // *Биоорганическая химия*. 2023. Т. 49. № 6. С. 649. (Shershov V.E., Lapa S.A., Levashova A.I., Shishkin I.Y., Shtylev G.F., Shekalova E.Y. et al. Synthesis of fluorescent-labeled nucleotides for labeling of isothermal amplification products // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 1151. <https://doi.org/10.1134/S1068162023050242>)

ARTIFICIAL MODIFIED NUCLEOTIDES FOR THE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION PRODUCTS

E. V. Suprun^{a, b, *}, S. A. Khmeleva^b, K. G. Ptitsyn^b, L. K. Kurbatov^b, S. P. Radko^b

^a*Department of Chemistry, Moscow State University, 119991, Moscow, Russia*

^b*Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, 119121, Moscow, Russia*

*E-mail: lenasuprun@mail.ru

Abstract. The review describes the fundamental electrochemical properties of nucleic acids manifested on solid electrodes, with an emphasis on the spatial structure of macromolecules. The formation of the double helix impedes the contact of the electroactive groups of the nitrogenous bases with the electrode surface, resulting in the disappearance of the analytical signal of deoxyribonucleic acid (DNA). The insufficient electroactivity of the double-stranded DNA is overcome by introducing electrochemically active fragments into the nucleic acid sequence through the polymerase incorporation of chemically modified nucleotides. Currently, an extensive range of artificial nucleotides has been synthesized, which contain various electroactive groups capable of both oxidation and reduction on electrode surfaces at different potentials. Artificial modified nucleotides must exhibit high electrochemical activity while also serving as good substrates for enzymes (polymerases) involved in nucleic acid amplification reactions. Introducing modified nucleotides instead of natural ones into polymerase reactions represents a compromise between the number of labels inserted in one amplicon and the length and quantity of the resulting products. Modified nucleotides find application in the detection of gene mutations and single-nucleotide polymorphisms, nucleic acid sequencing, determination of protein and peptide concentrations, and the detection of pathogenic viruses and bacteria. With the advancement of isothermal amplification methods, the development, synthesis, and investigation of artificial nucleotides have become highly relevant for creating new off-laboratory electrochemical nucleic acid analyzers.

Keywords: nucleic acid, modified nucleotide, isothermal amplification, polymerase chain reaction, fluorimetry, voltammetry.