

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.113.4; 577.213.39

СУБСТРАТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ Су5-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЕЗОКСИУРИДИНА И ДЕЗОКСИЦИТИДИНА В РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ ПО ТИПУ КАТЯЩЕГОСЯ КОЛЬЦА

© 2025 г. П. А. Чиркова, С. А. Суржиков, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов,
А. В. Чудинов, С. А. Лапа*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия*

**e-mail: lapa@biochip.ru*

Поступила в редакцию 24.04.2024 г.

После доработки 06.06.2024 г.

Принята к публикации 10.06.2024 г.

Изучена кинетика амплификации и особенности индивидуального и совместного встраивания модифицированных дезоксирибонуклеотидтрифосфатов в изотермической амплификации ДНК по типу катящегося кольца (RCA). В исследование вошли синтезированные нами шесть пар Су-5-меченных трифосфатов дезоксиуридина (dU) и дезоксицитидина (dC) с аналогичными электронейтральными флуоресцентными заместителями внутри пары, но различающихся для разных пар. Выявлено влияние длины линкера между флуорофором и пиримидиновым основанием на плотность встраивания: нуклеотиды с длиной линкера в шесть атомов углерода встраиваются в растущую цепь ДНК лучше, чем с тремя атомами углерода. Обнаружено, что совместное введение в реакцию трифосфатов в эквивалентной суммарной концентрации не усиливает ингибирующий эффект, что дает основания для более детального изучения одновременного применения флуоресцентно-меченных dU и dC.

Ключевые слова: изотермическая амплификация по типу катящегося кольца, флуоресцентно-меченные dNTP

DOI: 10.31857/S0026898425010086, **EDN:** HCQMZQ

ВВЕДЕНИЕ

Амплификация нуклеиновых кислот — фундаментальный метод молекулярной биологии и генетических исследований. С помощью этого метода можно накопить количество ДНК- или РНК-фрагментов, необходимое для дальнейших анализов, таких как секвенирование, гибридизация и другие. Одно из наиболее перспективных направлений получения анализируемого образца ДНК — изотермическая амплификация, не требующая термоциклера [1], в том числе, реакция амплификации по типу “катящегося кольца” (rolling circle amplification, RCA) [2].

Использование флуоресцентных меток с высокими квантовыми выходами и возможность их введения в ДНК непосредственно в процессе амплификации позволяют повысить чувствительность и надежность диагностических систем, основанных на гибридизационном анализе либо амплификации на твердой под-

ложке (биологические микрочипы). Одним из наиболее востребованных классов флуорофоров для введения меток в ДНК являются флуоресцентные цианиновые красители ряда Су5 [3]. Су5-пиримидиновые нуклеотиды способны эффективно встраиваться в формирующуюся цепь ДНК в процессе амплификации. Это позволяет визуализировать и измерять уровень амплификации в реальном времени, что имеет важное значение для мониторинга и оптимизации процесса [4]. Однако существует проблема ингибирования реакции, что может привести к формированию артефактов и искажению результатов амплификации. Возможным решением для поднятия чувствительности анализа может стать параллельное введение в реакцию разноименных Су5-трифосфатов без увеличения их суммарной концентрации в реакционном растворе.

В настоящей работе проведено комплексное изучение субстратной эффективности синте-

зированных нами шести пар трифосфатов дезоксиуридина и дезоксицитидина в варианте изотермической амплификации RCA с использованием полимеразы BST 3.0. Эта работа расширяет начатые нами исследования двух пар модифицированных дезоксиуридинтрифосфатов [5]. Изучена кинетика амплификации с определением эффективности RCA (E_r) и плотность встраивания в растущую цепь ДНК каждого из меченых дезоксинуклеозидтрифосфатов (K). Изучено влияние структуры флуорофора и природы самого трифосфата (dU или dC) на степень ингибирования реакции. В качестве модельной матрицы для амплификации использовали полногеномную ДНК одного из важных возбудителей пневмонии — золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. Геномная ДНК *S. aureus* (ATCC 25923) была выделена и деконтаминирована на базе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk, Россия) согласно [6].

Праймеры и другие олигонуклеотиды. Праймеры для RCA-амплификации сконструировали с помощью сетевого ресурса Integrated DNA Technologies (idtdna.com), специфичность анализировали с использованием алгоритма BLAST (NIH, США). Использовали два праймера: прямой — 5'-CGATAGACGATACCTGCCATCG-3' и обратный — 5'-ATCGTCATCTGCATTCCATC-3'.

Для создания кольцевого видоспецифичного олигонуклеотида синтезировали линейный 90-мерный олигонуклеотид, Ph-TTAGAGGCATGTGGTTATGCTAGCAACAGATAGACAAGATGGAATGCAGATGACGATAGACGATACCTGCCATCGTTTTGGCTTGCATTA-3', фосфорилированный по 5'-концу, где Ph — фосфат.

Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA ("Applied Biosystems", США) по стандартному регламенту и очищали на колонке BDS Hypersil C18 ("Thermo", США).

RCA в режиме реального времени с флуоресцентно-мечеными трифосфатами. Для создания закольцованного 90-мерного олигонуклеотида использовали T4-лигазу ("NEB", США) и геномную ДНК *S. aureus*. Полученный кольцевой олигонуклеотид после очистки на микроколонках набора GeneGET Purification kit ("Thermo") и измерения концентрации использовали в качестве матрицы в RCA.

Реакционная смесь содержала природные dNTP в концентрации 0.2 мМ, 1.6 ед. BST 3.0 ДНК-полимеразы ("New England Biolabs", США) и соответствующий ей реакционный буфер в количестве, рекомендуемом производителем; различные меченые dUTP и dCTP [7–9] в концентрации 32 мкМ при индивидуальном введении или 16 мкМ каждого при совместном; кольцевую матрицу (10^4 копий) и специфичные праймеры в концентрации 5 пмоль на 20 мкл реакционного объема. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Gentier 96E ("Tianlong", Китай) в режиме реального времени по следующей программе: 50 мин при 65°C при съемке сигнала флуоресценции 1 раз в минуту, далее режим хранения (10°C). Накопление продукта реакции визуализировали с помощью интеркалирующего красителя EvaGreen ("Biotium", США).

Очистка продуктов реакции. Продукты RCA освобождали от праймеров и трифосфатов дезоксинуклеозидов (в том числе меченых) с помощью набора GeneGET Purification kit ("Thermo") в соответствии с инструкцией производителя. Полученный продукт в реакционном объеме 20 мкл смывали с колонки GeneGET равным объемом воды Milli-Q. С помощью электрофореза в агарозном геле и возбуждения флуоресценции на длине волны 630 нм контролировали степень очистки от флуоресцентно-меченных dNTP для исключения их влияния при последующем спектрофотометрическом определении количества метки, включившейся в ДНК.

Электрофорез в агарозном геле. Полученные в ходе изотермической амплификации продукты разделяли в 4%-ном агарозном геле (Agarose LE, "Helicon", Россия) в течение 40 мин при 10 В/см, затем окрашивали в течение 10 мин с помощью SYBR Green I ("Molecular Probes", США) в 1 × буфере TBE ("Хеликон", Россия). Для визуализации использовали систему геледокументирования ChemiScope 6200 Touch ("Clinx Science Instruments", КНР). Общую детекцию ДНК осуществляли с использованием встроенных LED-светодиодов и светофильтров "Green light excitation/emission" и окрашивания SYBR Green I; избирательную детекцию олигонуклеотидов, меченных флуоресцентными красителями ряда $Cy5$, проводили с использованием встроенных LED-светодиодов и светофильтров "Red light excitation/emission".

Спектрофотометрия. Спектрофотометрический анализ проводили на приборе NanoPhotometer NP80 ("Implen", Германия) на длинах волн 260 и 647 нм для расчета выходов

суммарной ДНК и включившейся флуоресцентной метки соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе исследованы шесть пар модифицированных производных дезоксиуридина и дезоксицитидина с аналогичными флуоресцентными заместителями внутри пары и различающиеся длиной линкера между флуорофором и азотистым основанием, а также длиной линкера между вторым гетероциклом флуорофора и четвертичной аммониевой группой, входящей в состав красителя. В качестве контрольной выбрали пару dU и dC, в которой Cy5-краситель связан с азотистым основанием посредством линкера через сульфогруппу (U_K и C_K). В настоящее время меченый дезоксиуридинтрифосфат U_K широко используется в технологии гелевых микрочипов [6, 8]. Структурные формулы меченых дезоксинуклеотидов представлены на рис. 1, структуры R_{1-4} указаны в табл. 1.

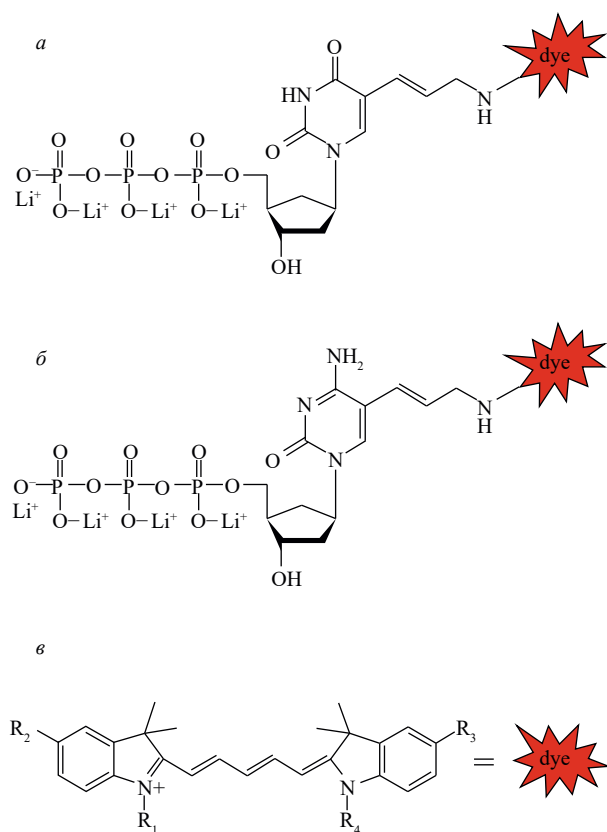


Рис. 1. Структурные формулы азотистых оснований и флуорофора. *a* — Флуоресцентно-меченный 5-аллиламин-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфат (dUTP-Dye); *б* — флуоресцентно-меченный 5-аллиламин-2'-дезоксицитидин-5'-трифосфат (dCTP-Dye); *в* — флуоресцентный краситель (Dye). R_{1-4} приведены в табл. 1.

Мы определяли такие показатели субстратной эффективности модифицированных dU и dC, как величина E_t (эффективность амплификации), позволяющая оценить степень ингибирования RCA; выход целевого продукта; коэффициент встраивания “ K ”. Для повышения точности определения ингибирующего эффекта был скорректирован алгоритм расчета E_t , представленный в [5]: учитывали только время накопления сигнала от начала экспоненциального роста кривой накопления сигнала до выхода на плато вместо общего времени проведения реакции. Данные представлены в табл. 2.

Кинетику реакции изучали в RCA с применением полимеразы Bst 3.0. Концентрацию Cy5-dNTP определяли, проводя амплификацию с разными их концентрациями — от 16 до 64 мкМ. После сравнения таких показателей, как выход продукта и степень ингибирования реакции, выбрали оптимальную для индивидуального встраивания концентрацию меченых трифосфатов, равную 32 мкМ. При одновременном применении использовали по 16 мкМ dU и dC, т.е. их суммарная концентрация была равна оптимальной для индивидуального введения в реакцию. Степень ингибирования, показателем которого является эффективность амплификации E_t , рассчитывали по величине угла наклона прямого участка кривой накопления, представленной в логарифмическом масштабе [10]. Кривые накопления сигналов представлены на рис. 2.

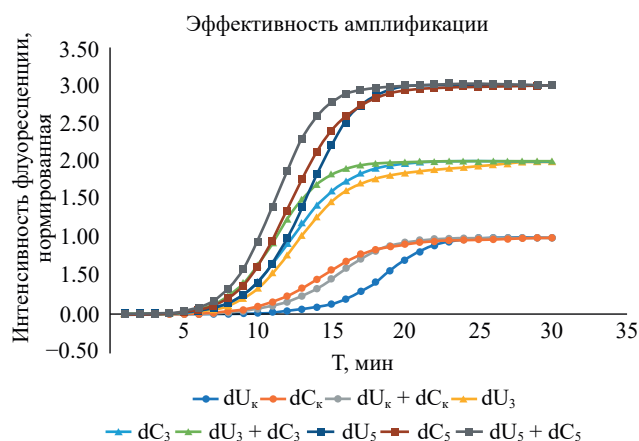


Рис. 2. Кинетика амплификации RCA при индивидуальном и при совместном введении в реакцию меченых дезоксинуклеозидтрифосфатов с эквивалентной суммарной концентрацией (пояснения в тексте). Для наглядности в каждой группе кривые нормированы по максимуму величины флуоресцентного сигнала.

Таблица 1. Флуоресцентно-меченные нуклеозидтрифосфаты R₁₋₄

Нуклеозид-трифосфат	№ синтеза	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
dU _к	49	C ₂ H ₅	SO ₂ NHCO(CH ₂) ₆ CONHCH ₂ (CH) ₂ dUTP	SO ₃ ⁻	C ₂ H ₅
dC _к	129	C ₂ H ₅	SO ₂ NHCO(CH ₂) ₆ CONHCH ₂ (CH) ₂ dCTP	SO ₃ ⁻	C ₂ H ₅
dU ₁	2	(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dUTP	H	SO ₃ ⁻	C ₂ H ₅
dC ₁	128	(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dCTP	H	SO ₃ ⁻	C ₂ H ₅
dU ₂	79	(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dUTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₃ ⁺
dC ₂	128	(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dCTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₃ ⁺
dU ₃	81	(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dUTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₅ N(CH ₃) ₃ ⁺
dC ₃	128	(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dCTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₅ N(CH ₃) ₃ ⁺
dU ₄	80	(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dUTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₃ ⁺
dC ₄	128	(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dCTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₃ ⁺
dU ₅	82	(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dUTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₅ N(CH ₃) ₃ ⁺
dC ₅	128	(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₅ CONHCH ₂ (CH) ₂ dCTP	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₅ N(CH ₃) ₃ ⁺

Видно, что одновременное введение в реакцию обоих модифицированных трифосфатов не приводит к снижению скорости накопления продукта.

Продукты реакции очищали на микроколонках с мембранами на основе диоксида кремния для последующего измерения плотности встраивания метки спектрофотометрическим методом. Это позволило количественно убрать непрореагировавшие флуоресцентно-меченные трифосфаты и тем самым гарантировать получение сигнала только от меток, которые встроились в цепи ДНК в процессе их роста. На рис. 3 представлена электрофореграмма в двухволновом режиме, позволяющая визуально оценить степень очистки от свободных флуоресцентно-меченных Су5 dNTP.

Выход продукта определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Для оценки плотности встраивания метки использовали коэффициент встраивания “K” — соотношение поглощения образца на длине волны 647 нм (метка) и на 260 нм (ДНК).

Обнаружено влияние длины линкера между флуорофором и пиримидиновым основанием на плотность встраивания трифосфатов дезоксинуклеозидов. Удлинение линкера с трех до шести атомов углерода повысило способность полимеразы воспринимать меченые нуклеозидтрифосфаты в качестве субстрата. На рис. 4 представлены три электрофореграммы: “зеленый канал”, окраска SYBR, визуализация суммарного продукта реакции (a); “красный” канал, проявление флуоресценции Су5-мечен-

Таблица 2. Сводная таблица показателей субстратной эффективности Су5-меченных dU и dC

dNTP, мкМ	Выход продукта $\pm \sigma$, мкг	$E_t \pm \sigma$	$K \pm \sigma$
dU _к (32)	1.88 \pm 0.02	1.21 \pm 0.05	0.36 \pm 0.005
dC _к (32)	2.14 \pm 0.1	1.30 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02
dU _к (16) + dC _к (16)	1.54 \pm 0.29	1.24 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01
dU ₁ (32)	0.76 \pm 0.02	1.11 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02
dC ₁ (32)	2.09 \pm 0.16	1.20 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01
dU ₁ (16) + dC ₁ (16)	0.96 \pm 0.2	1.16 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02
dU ₂ (32)	1.94 \pm 0.39	1.34 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02
dC ₂ (32)	2.25 \pm 0.31	1.34 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01
dU ₂ (16) + dC ₂ (16)	2.22 \pm 0.42	1.38 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01
dU ₃ (32)	2.36 \pm 0.03	1.34 \pm 0.03	0.14 \pm 0.005
dC ₃ (32)	2.58 \pm 0.21	1.35 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02
dU ₃ (16) + dC ₃ (16)	2.13 \pm 0.17	1.39 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01
dU ₄ (32)	2.28 \pm 0.17	1.30 \pm 0.01	0.24 \pm 0.005
dC ₄ (32)	2.42 \pm 0.05	1.29 \pm 0.08	0.18 \pm 0.03
dU ₄ (16) + dC ₄ (16)	2.12 \pm 0.24	1.38 \pm 0.02	0.20 \pm 0.03
dU ₅ (32)	2.40 \pm 0.13	1.31 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02
dC ₅ (32)	2.25 \pm 0.22	1.34 \pm 0.06	0.10 \pm 0.01
dU ₅ (16) + dC ₅ (16)	1.68 \pm 0.3	1.36 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02

ных трифосфатов (б); двухволновой режим, содержащий сигналы с обоих каналов (в). Видно, что в каждой паре меченых dU и dC с аналогичным флуорофором и линкером большей плотностью встраивания обладает производное уридина. На рис. 4б визуально можно оценить влияние удлинения линкера на плотность встраивания. Однако совместное использование dU и dC с коротким линкером показало большую плотность встраивания, чем индивидуальное. Это может говорить об отсутствии эффекта “суммарной концентрации” для таких нуклеозидтрифосфатов.

Удлинение углеродной цепи между четвертичной аммониевой группой, входящей в состав красителя, и соответствующим (вторым) гетероциклическим фрагментом флуорофора в парах с коротким линкером позволило получить большую плотность встраивания меченых трифосфатов как при совместном, так и при индивидуальном введении. При этом в парах с длин-

ным линкером такое же удлинение понизило плотность встраивания. Существенно большее влияние на субстратную эффективность оказывает длина линкера между азотистым основанием нуклеотида и флуорофором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестирование степени одновременного и индивидуального встраивания флуоресцентно-меченных трифосфатов с учетом выхода продукта в реакции RCA показало, что наибольшая субстратная эффективность, необходимая для повышения чувствительности анализа, достигается при введении в реакцию дезоксиуридинов с длинным линкером между азотистым основанием нуклеотида и флуорофором. Одновременное введение dU и dC выглядит перспективным для обеспечения универсальности диагностических систем при одновременном анализе нескольких ДНК-матриц различного GC-состава.

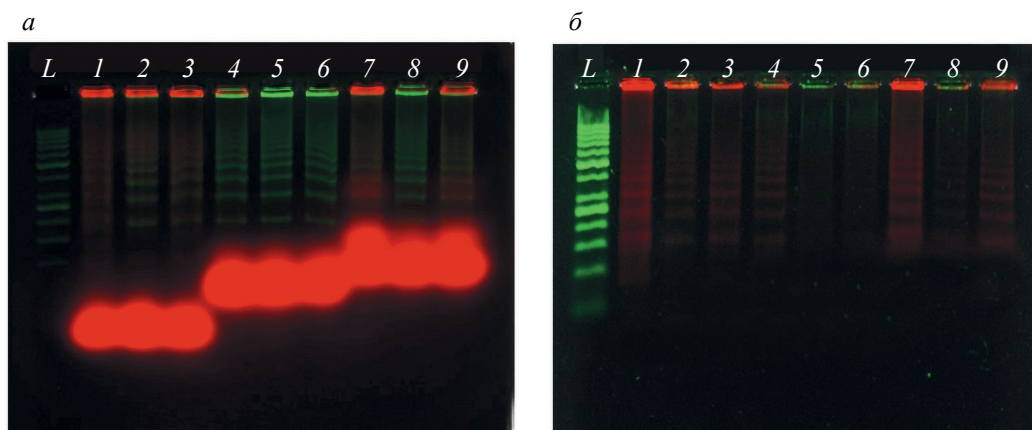


Рис. 3. Визуализация степени очистки продуктов реакции от свободных флуоресцентно-меченных нуклеозидтрифосфатов в двухканальном режиме возбуждения/детекции (“зеленый” канал 530/585 нм и “красный” канал 630/690 нм). *а* — Электрофореграмма продуктов RCA до очистки; *б* — после очистки. L — маркер длин ДНК GeneRuler 50 bp; 1 — dU_к; 2 — dC_к; 3 — dU_к+dC_к; 4 — dU₃; 5 — dC₃; 6 — dU₃+dC₃; 7 — dU₅; 8 — dC₅; 9 — dU₅+dC₅.

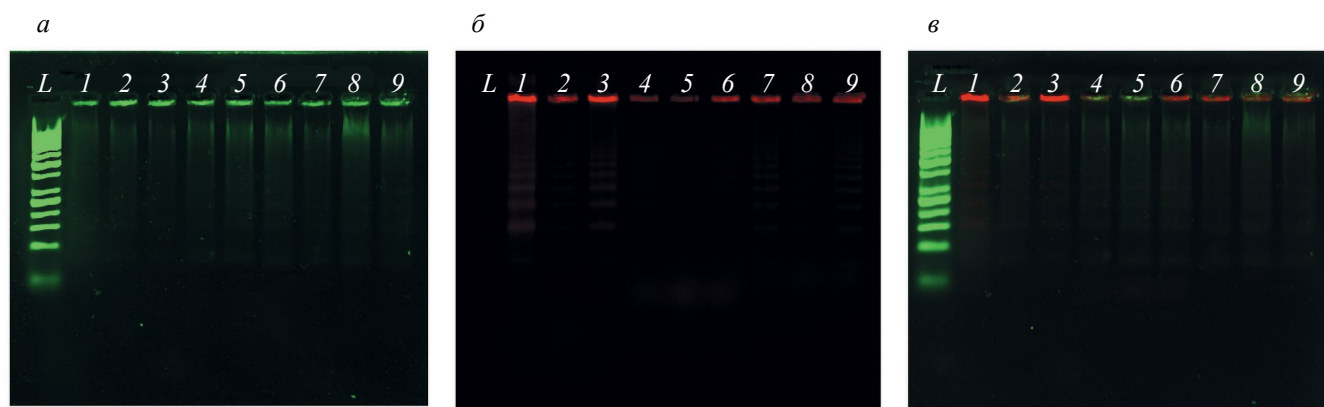


Рис. 4. Влияние длины линкера на плотность встраивания Cy5-нуклеотидов в RCA. *а* — Визуализация RCA на “зеленом” канале 530/585 нм; *б* — на “красном” канале 630/690 нм; *в* — в двухканальном режиме возбуждения и детекции. L — маркер длин ДНК GeneRuler 50 bp; 1 — dU_к; 2 — dC_к; 3 — dU_к + dC_к; 4 — dU₃; 5 — dC₃; 6 — dU₃ + dC₃; 7 — dU₅; 8 — dC₅; 9 — dU₅ + dC₅.

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

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oliveira B.B., Veigas B., Baptista P.V. (2021) Isothermal amplification of nucleic acids: the race for the next “gold standard”. *Front. Sensors*. **2**. <https://doi.org/10.3389/fsens.2021.752600>
- Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. (2014) Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3324–3341.
- Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis C.J., Waggoner A.S. (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* **4**, 105–111.
- Ren X., El-Sagheer A.H., Brown T. (2016) Efficient enzymatic synthesis and dual-colour fluorescent labelling of DNA probes using long chain azido-dUTP and BCN dyes. *Nucl. Acids Res.* **44**, e79.
- Лапа С.А., Чиркова П.А., Суржиков С.А., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Чудинов А.В. (2024) Сравнительный анализ поведения Cy5-пиримидиновых нуклеотидов в реакции амплификации по типу катящегося кольца. *Биоорган. химия*. **50**, 1351–1356.
- Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммури Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е.,

- Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека. *Молекуляр. биология*. **55**, 944–955.
7. Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. (2017) Synthetic route to novel zwitterionic pentamethine indocyanine fluorophores with various substitutions. *Dyes Pigments*. **147**, 199–210.
 8. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. (2018) dUTPs conjugated with zwitterionic Cy3 or Cy5 fluorophore analogues are effective substrates for DNA amplification and labelling by Taq polymerase. *Nucl. Acids Res.* **46**, e73.
 9. Шершов В.Е., Лапа С.А., Левашова А.И., Шишкин И.Ю., Штылев Г.Ф., Шекалова Е.Ю., Василюков В.А., Заседателев А.С., Кузнецова В.Е., Чудинов А.В. (2023) Синтез флуоресцентно-меченых нуклеотидов для маркирования продуктов изотермической амплификации. *Биоорган. химия*. **49**, 649–656.
 10. Ramackers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**, 62–66.

Substrate Efficiency of Cy5-Modified Derivatives of Deoxyuridine and Deoxycytidine in the Rolling Circle Amplification

© 2025 P. A. Chirkova, S. A. Surzhikov, V. E. Kuznetsova, V. E. Shershov,
A. V. Chudinov, S. A. Lapa*

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: lapa@biochip.ru

The kinetics of amplification and the features of individual and simultaneous incorporation of modified deoxynucleoside triphosphates in DNA during rolling circle amplification (RCA) have been studied. The study was carried out for six pairs of Sy5-labeled triphosphates of deoxyuridine (dU) and deoxycytidine (dC) previously synthesized with similar fluorescent substituents inside the pair. The effect of the linker length between the fluorophore and the pyrimidine base on the incorporation density was determined: nucleotides with a linker length of six carbon atoms are embedded in a growing DNA chain better than with three carbon atoms. It was found that the combined introduction of triphosphates into the reaction in an equivalent total concentration does not enhance the inhibitory effect, which gives grounds for a more detailed study of the simultaneous use of labeled dU and dC.

Keywords: rolling circle amplification, fluorescently labeled dNTPs