© Коллектив авторов, 2021

Козлов И.Б.¹, Лебедин М.Ю.², Гудима Г.О.¹, Сергеев И.В.¹, Кофиади И.А.¹

Фоторегулируемое отщепление олигонуклеотида как способ повышения эффективности полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией при анализе единичных клеток

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Благодаря совершенствованию технологий секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) появилась принципиально новая возможность анализа экспрессии групп генов, определяющих конкретную функцию и позволяющих отслеживать эволюцию клетки как в нормальных условиях, так и при развитии патологии. Технологии, при помощи которых изучают единичные клетки, позволяют отслеживать мутационные изменения в генах специфических клеточных популяций и находить связи с проявлением конкретных клинических признаков. Наибольший интерес в этом смысле представляют популяции лимфоцитов и их рецепторы, участвующие в распознавании антигенов. Однако существующие технологии scRNA-seq недостаточно эффективны для изучения рецепторных репертуаров лимфоцитов. Одним из ограничений метода является недостаточная эффективность синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на твердой фазе.

Цель исследования – разработать технологию синтеза и фоторегулируемого высвобождения олигонуклеотидов с поверхности твердофазного носителя для повышения эффективности синтеза кДНК на матричной РНК (мРНК) на примере гена α -цепи Т-клеточного рецептора отдельных клеток.

Материал и методы. Создана технология синтеза олигонуклеотидов на твердофазном носителе с возможностью их контролируемого высвобождения в раствор. Данный процесс обеспечивается встраиванием фоточувствительных молекул в структуру олигонуклеотида на стадии синтеза. Деструкция линкера происходит в условиях мягкого УФ-излучения, не повреждающего структуру биополимера, и приводит к существенному повышению эффективности обратной транскрипции (ОТ).

Результаты. В работе была использована олигонуклеотидная последовательность длиной 39 нуклеотидов, содержащая короткий спейсер, фоторазрушаемый линкер (РС-линкер от англ. photocleavable), уникальный молекулярный баркод, участок для гибридизации универсального праймера и фрагмент, специфичный к последовательности α -цепи Т-клеточного рецептора. Синтез проводили с помощью «инвертированных» амидитов с целью корректной ориентации олигонуклеотида на носителе, обеспечивающей синтез кДНК. Установлено, что встраивание РС-линкера в структуру олигонуклеотида позволяет высвобождать с поверхности носителя все доступные для УФ-индуцированного отщепления последовательности в течение 5 минут. Сравнение наработки целевого продукта в ОТ-реакциях с фотоактивацией и без продемонстрировало существенные отличия в количестве нарабатываемого продукта. Разница по количеству кДНК в 2 параллельных реакциях составила приблизительно 7 циклов ПЦР, что позволяет говорить о более чем 100-кратном превышении исходного количества специфической мишени в реакции с РС-линкером.

Заключение. В результате исследования разработана технология фоторегулируемого отщепления олигонуклеотидов с твердого носителя. Мы продемонстрировали, что РС-линкер не оказывает существенного влияния на эффективность синтеза полинуклеотидной цепи и может быть использован при твердофазном синтезе длинных дезоксирибонуклеотидных последовательностей. С помощью эмульсионной ПЦР установлено, что применение РС-линкера существенно повышает эффективность синтеза кДНК на мРНК единичных клеток.

Для корреспонденции
Кофиади Илья Андреевич –
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией
молекулярной иммуногенетики
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: kofiadi@mail.ru
<http://orcid.com/0000-0001-9280-8282>

Ключевые слова: твердофазный синтез; фотолиз; высвобождение олигонуклеотидов; PC-линкер; кДНК; эмульсионная ПЦР

Статья поступила 11.10.2021. Принята в печать 16.11.2021.

Для цитирования: Козлов И.Б., Лебедин М.Ю., Гудима Г.О., Сергеев И.В., Кофиади И.А. Фоторегулируемое отщепление олигонуклеотида как способ повышения эффективности полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией при анализе единичных клеток. Иммунология. 2021; 42 (6): 662–669. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-662-669>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-33-90076.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kozlov I.B.¹, Lebedin M.Yu.², Gudima G.O.¹, Sergeev I.V.¹, Kofiadi I.A.¹

Photoregulated oligonucleotide detachment as a way to improve the efficiency of polymerase chain reaction with reverse transcription for analysis at the single cell level

¹ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical and Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Due to the improvement of single cell RNA sequencing (scRNA-seq) technologies, a fundamentally new possibility to analyze the expression of groups of genes determining a specific function and allowing to trace the evolution of the cell both under normal conditions and during the development of pathology has appeared. Technologies, by means of which single cells are studied, make it possible to track mutational changes in genes of specific cell populations and find links with the manifestation of specific clinical features. Of greatest interest in this sense are lymphocyte populations and their receptors involved in antigen recognition. However, existing scRNA-seq technologies are not sufficiently effective for studying lymphocyte receptor repertoires. One of the limitations of the method is the insufficient efficiency of cDNA synthesis in the solid phase.

The aim of the study is to develop a technology for the synthesis and photoregulated release of oligonucleotides from the surface of a solid-phase carrier to increase the efficiency of cDNA synthesis from the mRNA of the α -chain T cell receptor gene of individual cells.

Material and methods. We developed a technology of oligonucleotide synthesis on a solid-phase carrier with the possibility of their release into a solution, if required. This process is provided by the incorporation of photosensitive molecules into the oligonucleotide structure at the synthesis stage. The linker is degraded under mild UV irradiation, which does not damage the biopolymer structure, resulting in release of the oligonucleotide sequence into the solution for the reverse transcription priming.

Results. A 39-nucleotide oligonucleotide sequence containing a short spacer, a photoactivated linker, a unique molecular barcode, a site for hybridization of the universal primer, and a fragment specific to the α -chain sequence of the T cell receptor were used. Synthesis was performed using «inverted» amidites in order to correctly orient the oligonucleotide on the carrier, ensuring cDNA synthesis. It was found that incorporation of the photosensitive PC-linker into the oligonucleotide structure, allows releasing all sequences available for UV-induced cleavage from the carrier surface within 5 min. Comparison of the production of the target product with and without photoactivation in the RT reactions showed significant differences in the amount of product obtained. The difference in the amount of cDNA in the two parallel reactions was approximately 7 PCR cycles, which suggests more than 100-fold excess of the initial amount of the specific target in the PC-linker reaction.

Conclusion. As a result of the study, we developed a technology for photoregulated oligonucleotide detachment from a solid carrier. We demonstrated that the PC-linker has no signifi-

For correspondence

Ilya A. Kofiadi – Dr. Sci., PhD,
Head of the Molecular
Immunogenetics Laboratory
of NRC Institute of Immunology,
FMBA of Russia,
Moscow, Russian Federation
E-mail: kofiadi@mail.ru
<http://orcid.com/0000-0001-9280-8282>

cant effect on the efficiency of polynucleotide chain synthesis and can be used in solid-phase synthesis of long deoxyribonucleotide sequences. Using emulsion PCR, we found that the use of a photodegradable linker significantly increases the efficiency of cDNA synthesis from single cell mRNA.

Keywords: solid-phase synthesis; photolysis; oligonucleotide release; PC-linker; cDNA; emulsion PCR

Received 11.10.2021. **Accepted** 16.11.2021.

For citation: Kozlov I.B., Lebedin M.Yu., Gudima G.O., Sergeev I.V., Kofidi I.A. Photoregulated oligonucleotide detachment as a way to improve the efficiency of polymerase chain reaction with reverse transcription for analysis at the single cell level. *Immunologiya*. 2021; 46 (6): 662–9. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-662-669> (in Russian)

Funding. The study was supported by RFBR, project number 19-33-90076.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Реализация международного проекта «Геном человека» привела к существенному развитию технологий молекулярно-генетического анализа. Появились новые методы определения последовательности нуклеиновых кислот (секвенирования) и оборудование, предназначенное для параллельного анализа большого числа молекул [1]. Технологии высокоэффективного параллельного секвенирования (в англоязычной литературе используется термин «Next Generation Sequencing», или NGS) значительно повысили производительность анализа и снизили его стоимость в десятки тысяч раз [2]. Одновременно с этим расширилась область применения метода NGS. Он все чаще используется в клинической практике при диагностике наследственных патологий, установлении мутационного профиля и анализе экспрессии генов на уровне транскриптома [3].

Однако несмотря на преимущества стандартных протоколов NGS, адаптированных для анализа тотальной ДНК и РНК из многих популяций клеток, получение полной информации о мутационной изменчивости и связи между генами, вовлеченными в реализацию конкретной функции, возможно только при анализе на уровне единичных клеток. Благодаря таким методам, как секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq), появилась возможность оценки не отдельных генов, но целых сетей генной регуляции, определяющих физиологические функции клеток и характеризующих особенности их развития [4]. Даже у схожих между собой клеточных линий экспрессия генов может быть весьма изменчива. Эти изменения могут носить патологический характер [5]. Анализ транскриптов на уровне единичных клеток позволяет получить информацию о состоянии клеток с привязкой к конкретной ткани, в том числе опухолевой [6].

Для обеспечения независимой детекции транскриптов от отдельных клеток необходимо проводить этапы выделения и маркировки РНК в изолированном микрообъеме, содержащем одну клетку. E.Z. Macosko и соавт. предложили подход на основе эмульсионной ПЦР (Drop-seq) [7]. Исследование было выполнено

с использованием микрофлюидных технологий и твердофазного олигонуклеотидного синтеза, с помощью которого были созданы частицы с закрепленными на их поверхности синтетическими олигонуклеотидами.

Независимо от цели применения твердофазного подхода, наличие линкера, который соединяет субстрат с биополимером, образуя сильную и стабильную связь, которая не подвергается модификации на протяжении всех стадий синтетического процесса и контролируемо разрушается для высвобождения целевого продукта, является большим преимуществом, открывающим широкие возможности [8–10]. Именно для этих целей были созданы направленно разрушаемые молекулы, которые благодаря контролируемой деградации находят широкое применение в различных направлениях науки.

В данной работе реализован один из возможных подходов высвобождения синтетических олигонуклеотидов (ОН) с поверхности твердофазного носителя с использованием фоторазрушаемого линкера. Мы адаптировали эту технологию к решению задачи синтеза кДНК на мРНК, полученной из единичных лимфоцитов. Изоляция клеток и частицы-носителя в микрообъеме (капле эмульсии) позволяет высвободить ОН с поверхности носителя и провести реакцию полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) не на твердой фазе, а в растворе практически без потери эффективности. Контролируемое фоторазрушение снимает ряд ограничений метода в части подбора условий для обеспечения высокой плотности посадки ОН на носителе и необходимости встраивания спейсеров, увеличивающих длину ОН и тем самым снижающих точность синтеза на его 3'-концевой части. Мы считаем, что разработанная нами технология в комплексе с существующим оборудованием для приготовления эмульсий может использоваться для высокочувствительного анализа РНК-транскриптов на уровне единичных клеток на этапе подготовки библиотек кДНК. Технология может быть легко адаптирована под любую из существующих NGS-платформ.

Материал и методы

Реагенты. Химические реагенты, которые использовались в ходе олигонуклеотидного синтеза, приобре-

тены в компании Sigma-Aldrich (США) (дихлоруксусная кислота, дихлорметан, тетрагидрофуран, лутидин, пропионовый ангидрид, 1-метилимидазол, пиридин). При растворении фосфорамидитов использовался сухой ацетонитрил с содержанием влаги не более 3 ppm (for DNA synthesis, BioSolve, Нидерланды). «Инвертированные» фосфорамидиты нуклеотидов (dA-5'-CE-фосфорамидит, dC-5'-CE-фосфорамидит, dmf-dG-5'-CE-фосфорамидит, dT-5'-CE-фосфорамидит), ПЭГ-спейсер (Spacer Phosphoramidite 18) и РС-линкер (PC Linker Phosphoramidite) приобретены в GlenResearch (США). В качестве твердофазного носителя использовался Toyopearl HW-65S (Tosoh Bioscience LLC, Япония) со средним диаметром частиц 30 мкм. Синтез олигонуклеотидов проводился на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе Polygen (Германия).

Синтез олигонуклеотидов. Перед синтезом ОН-цепи проводили модификацию твердофазной поверхности полистирольных частиц ПЭГ- и РС-фосфорамидитами. Высушенные навески фосфорамидитов (Spacer Phosphoramidite 18 и PC Linker Phosphoramidite) во флаконах на лиофильной сушке (FreeZone Triad Cascade Benchtop Freeze Dryer, Labconco, США) в течение 2 ч разводили безводным ацетонитрилом под током аргона до расчетной концентрации 0,07 М. Присоединяли флаконы с полученными растворами к ДНК-синтезатору. В лунки слайдера загружали по 20 мг твердофазного носителя Toyopearl HW-65S (Tosoh Bioscience GmbH, Германия). Синтетические стадии (кроме присоединения) оставляли неизменными. Время конденсации модификаторов увеличили до 3 мин по сравнению с обычными нуклеотидами. Присоединение каждого модификатора осуществляли последовательно, в свой цикл. Стадию деблокирования защитных групп с азотистых оснований и межнуклеотидной связи проводили в 0,5 мл раствора АМА (раствор метиламина и раствор аммиака 1:1) в течение 2 ч при комнатной температуре.

Фотолиз баркодированных нуклеотидов. Водную эмульсию частиц с ОН-последовательностями, присоединенными к поверхности через РС-линкер (PC Linker Phosphoramidite), помещали в УФ-проницаемое стекло (Fluorodish, WPI, Великобритания) и облучали мягким УФ-излучением (300–350 нм) в течение 1 ч. Через 10 сек, 30 сек, 1, 2, 4, 8, 16, 30 и 60 мин отбирали аликвоты водной эмульсии для измерения концентрации высвобожденного ОН с поверхности частицы. Осаждали частицы в растворе ОН с помощью центрифуги. Затем отбирали супернатант для измерения оптической плотности с помощью УФ-спектрофотометра (UV-1800, Shimadzu, Япония) при длине волны $\lambda = 265$ нм. Строили диаграмму зависимости числа высвобожденных ОН от увеличения времени инкубации.

Проведение обратной транскрипции в эмульсии.

Для приготовления эмульсии использовали частицы с синтезированными ОН, которые помещали в реакторы с буфером и реагентами для ОТ-ПЦР. Формирование эмульсии проходило в чипе, изготовленном методом

литографии, в котором смешивались клетки, частицы и реагенты. Полученную эмульсию разделяли на необходимое количество реакционных пробирок по 50 мкл эмульсии в каждую и помещали в амплификатор. Проводили ОТ-ПЦР, используя следующий температурный режим:

- 2 цикла нагревания/охлаждения 50 °C/2 °C для температурного лизиса клеток и высвобождения РНК в реакционный объем;
- инкубация 30 мин при 50 °C для специфичного отжига праймеров на РНК и синтеза кДНК;
- прогрев 5 мин при 95 °C для инактивации ревертазы;
- 30 циклов ПЦР-амплификации: 94 °C 30 сек, 60 °C 30 сек, 72 °C 30 сек.

После проведения ОТ-ПЦР 4 реакционных объема по 50 мкл переносили в одну 1,5 мл пластиковую пробирку и добавляли ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ для блокировки активности полимеразы. Затем экстрагировали водную фазу из эмульсии с помощью диэтилового эфира согласно описанию [19], используя соотношение объемов диэтиловый эфир : эмульсия = 5:1. Продукт реакции выделяли из экстрагированной водной фазы с помощью набора реагентов Qiagen Qiamp DNA (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

После этого проводили селекцию фрагментов нужной длины с использованием набора реактивов AMPure beads (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя.

Всю полученную в эмульсии кДНК амплифицировали с помощью ПЦР с прямым праймером, гибридирующимся с последовательностью гена α -цепи Т-клеточного рецептора и обратным праймером, гибридирующимся с 3'-концом молекулы кДНК, сформированном универсальной адаптерной частью на 5'-конце праймера для синтеза кДНК, используя следующий температурный режим:

- предварительная денатурация ДНК 95 °C – 1,5 мин.
- 32 цикла ПЦР: денатурация 95 °C – 10 сек, отжиг 60 °C – 20 сек, элонгация 72 °C – 20 сек.

Наличие продукта амплификации оценивали на 18, 20, 23, 27 и 32-м цикле реакции с помощью гель-электрофореза. Длина ампликона ~ 300 п.н.

Затем очищали продукт реакции с использованием набора реактивов AMPure beads (Beckman Coulter) согласно инструкции производителя. Полученную библиотеку ДНК-фрагментов анализировали с помощью агарозного электрофореза.

Результаты

В работе была синтезирована ОН-последовательность длиной 39 нуклеотидов. Полученный синтон содержал 6-членный ПЭГ-спейсер, фоторазрушаемый линкер, уникальный молекулярный баркод, участок для гибридизации универсального праймера и фрагмент, специфичный к последовательности α -цепи Т-клеточного рецептора. Структура синтезированного олигонуклео-

Рис. 1. Структура синтетического олигонуклеотида на твердофазном носителе. Фотолиз РС-линкера с образованием терминальных монофосфатов при УФ-воздействии (365 nm)

тида представлена на рис. 1. Молекулярный баркод в составе последовательности был синтезирован методом «split-and-pool», который представляет собой серию последовательных реакций присоединения нуклеотидов с объединением носителя на каждом этапе синтеза [7]. Уникальность синтезированной последовательности обеспечивается равновероятным (или практически равновероятным) встраиванием каждого из 4 нуклеотидов в синтезируемую на частице носителя полинуклеотидную цепь. Для этого на 1-м этапе все частицы разделяли на 4 реактора, в которых происходила конденсация конкретного нуклеотида. Затем проводили объединение всего носителя с синтезированными последовательностями в 1 пробирку и тщательно перемешивали. В подготовленные чистые реакторы закладывали в равных пропорциях перемешанный носитель для

осуществления следующего цикла присоединения. Данный подход позволяет получить в составе ОН короткий фрагмент, последовательность которого индивидуальна для каждой частицы. Впоследствии, после проведения ОТ-ПЦР в эмульсии с отдельными клетками и секвенирования продуктов реакции, последовательности с одинаковым баркодом будут маркировать транскрипты, полученные из конкретной клетки.

Отщепление синтезированного ОН проходило по реакции Норриша (Norris) II типа [12]. В процессе фотолиза осуществляется возбуждение нитрогруппы бензольного кольца, что приводит к внутримолекулярному отщеплению водорода в γ -положении и образованию высокочувствительного нитрозосоединения с последующим элиминированием из реакции. Результатом многостадийного фотохимического процесса является образование терминальных фосфатов. Установлено, что встраивание РС-линкера в структуру олигонуклеотида во время синтеза позволяет высвободить с поверхности носителя все последовательности, доступные для УФ-индуцированного отщепления (рис. 2). Разрушение РС-линкера и, как результат, концентрация свободного ОН достигает своих максимумов в течение 4 мин при воздействии мягкого УФ-излучения (365 nm). Таким образом, можно говорить, что подобранные условия обеспечивают эффективное разрушение РС-линкера и высвобождение полинуклеотидной цепи.

Благодаря использованию «инвертированных» фосфорамидитов в процессе синтеза достигнута корректная ориентация ОН на носителе, обеспечивающая синтез кДНК. Обратную транскрипцию проводили с обеими группами олигонуклеотидов – иммобилизованными на поверхности твердой фазы и свободными,

Рис. 2. Фотолиз РС-линкера. Зависимость количества высвободившегося олигонуклеотида от времени воздействия УФ-излучения

На графике видно, что к 4-й минуте УФ-воздействия на суспензию частиц концентрация высвобожденного олигонуклеотида практически не изменяется и выходит на плато.

отщепленными под воздействием УФ-излучения. ОН предварительно выравнивали по концентрации (по количеству использованных в реакции частиц). Сравнение наработки кДНК в ОТ-реакциях с ОН, несущими РС-линкер и без него, показало значительные отличия в эффективности ОТ-ПЦР, выраженном в количестве наработанного продукта (рис. 3). Отставание в наработке ПЦР-продукта в параллельной реакции без РС-линкера составило приблизительно 7 циклов ПЦР.

Обсуждение

Применение РС-линкера для конъюгации биологических молекул с синтетическими ОН нашло широкое применение в современных разработках и технологических подходах в области протеомики и транскриптомики [20–23]. Одним из таких технологических решений является метод, предложенный E.Z. Macosko и соавт. [7], в котором используются ОН, ковалентно связанные с полистирольной частицей. Структура синтезированного ОН в данном варианте метода включает политимидиновый участок для захвата мРНК из раствора, клеточный баркод (последовательность нуклеотидов, полученная в результате их комбинаторного присоединения к синтезируемой полинуклеотидной цепи), состоящий из 12 оснований, и уникальный молекулярный идентификатор (Unique molecular identifier, UMI), обеспечивающий присвоение метки каждой мРНК единичной клетки, а также общий праймер, обеспечивающий старт ПЦР.

Полученные частицы, исследуемые клетки, реагенты для лизиса и обратной транскрипции изолируются в каплях эмульсии, где происходит праймирование мРНК и синтез кДНК. После разрушения эмульсии кДНК, содержащая все необходимые метки, очищается и используется в реакции секвенирования.

Мы попытались воспроизвести данный подход для исследования особенностей Т-клеточного иммунного ответа, однако выяснили, что он имеет ряд недостатков и, в первую очередь, это касается низкой эффективности синтеза кДНК на твердом субстрате. Вероятно, возникновение стерического фактора при плотной посадке ОН на поверхности частицы мешает эффективной работе ферментов. Для исключения этой проблемы метод, предложенный E.Z. Macosko и соавт., был модифицирован встраиванием РС-линкера между ОН и поверхностью частицы в процессе синтеза, что позволило под воздействием УФ-излучения отделить синтезированный ОН от частицы. Мы предположили, что переход молекулы в раствор уменьшит влияние факторов, препятствующих успешному прохождению реакции, и обеспечит наработку ПЦР-продукта с эффективностью, сравнимой со стандартной ОТ-ПЦР.

Таким образом, ключевым аспектом представленной в настоящей работе технологии является использование фоторегулируемого отщепления ОН как способа повышения эффективности ОТ-ПЦР. Разработанная технология синтеза ОН-последовательности, примененная в комплексе с рядом микрофлюидных и молекулярно-

Рис. 3. Электрофорез. Нарботка продукта синтеза кДНК единичной клетки с использованием 2 типов частиц: частицы с иммобилизованными баркодированными олигонуклеотидами (слева), частицы с баркодированными олигонуклеотидами со вставкой РС-линкера (справа)

Под № 5, 6 понимаются реакции с одинаковым количеством частиц (1000 ед.) и разным количеством РНК (200 и 20 нг, соответственно), взятых для реакции.

биологических подходов, позволяет существенно повысить эффективность оценки особенностей функционирования отдельных популяций клеток. Это создает предпосылки к удешевлению и повышению точности исследований в области транскриптомики комплексных биологических процессов, в частности, механизмов и путей развития специфического иммунного ответа.

Разработанная нами технология обладает рядом преимуществ по сравнению со стандартными подходами. Линкерные молекулы, которые применяются в стандартном твердофазном олигонуклеотидном синтезе, состоят из фрагментов, восприимчивых либо к действию сильных кислот, либо оснований или нуклеофилов. С использованием последних, в свою очередь, связаны проблемы совместимости с более чувствительными молекулярными структурами (белками), что ограничивает применение олигонуклеотидов в биомедицине. В свою очередь, разрушение линкера, которое происходит за счет воздействия светового излучения разных длин волн, не требует использования кислотного, щелочного или металлического активирования. Это обеспечивает основное преимущество фоторазрушаемых линкеров при проведении молекулярно-генетических исследований.

Помимо этого, использование РС-линкеров позволяет разрушать связи в конкретном месте, а также не требует использования дополнительных реагентов и позволяет контролировать процесс высвобождения

по времени. Данная технология также является безопасной для окружающей среды. Умеренные условия проведения реакции являются важным преимуществом в экспериментах биологического скрининга, где контаминация продуктами разрушения линкера является пагубной [8]. Нами также показано, что важной особенностью использованного в работе подхода является отсутствие повреждающего эффекта – несмотря на то, что деструкция фоточувствительной группы, имеющей нитробензильный фрагмент, происходит при поглощении испускаемого света в ультрафиолетовом диапазоне, это не оказывает существенного влияния на биополимеры [11]. Разрушение РС-линкера проходит достаточно быстро, что позволяет избежать излишнего облучения ДНК и РНК.

Кроме того, следует отметить, что разработанный подход позволяет высвободить синтетический ОН без обременения дополнительными группами, которые способны повлиять на эффективность последующих биохимических реакций. Отсутствие нежелательных фрагментов на концах ОН, которые могут возникать в процессе деструкции линкеров, позволяет обеспечить оптимальные термодинамические условия для гибридизации с мРНК и повысить эффективность работы РНК-полимеразы. Именно с этой целью в работе нами был использован универсальный РС-линкер на основе *o*-нитробензильной группы, который специально разработан таким образом, что в процессе его разрушения образуются терминальные фосфаты, и это не мешает нормальной работе фермента.

Мы подтвердили данное предположение экспериментом, в котором участвовали оба типа частиц с синтезированными ОН. Эксперимент проводился в стеклянных чашках, способных пропускать УФ излучение. Разницу в эффективности ОТ-ПЦР мы оценивали в серии параллельных реакций с сохранением связи синтезированного олигонуклеотида с поверхностью частицы и с разрушением связи по месту встраивания фоточувствительной группы. При условии, что на каждом ци-

кле ПЦР происходит 2-кратное увеличение количества мишени, по результатам эксперимента можно судить о более чем 100-кратном превышении исходного количества специфической мишени в реакции с РС-линкером. Синтезированный олигонуклеотид содержал функциональные элементы, необходимые для мечения транскриптов, полученных из отдельных клеток, и специфической наработки варибельного фрагмента гена α -цепи Т-клеточного рецептора. Это позволяет прогнозировать успешное применение разработанной нами технологии в экспериментах, основанных на секвенировании РНК единичных клеток.

Заключение

В ходе исследования мы разработали технологию синтеза и фоторегулируемого высвобождения олигонуклеотидов с поверхности твердофазного носителя. Мы продемонстрировали, что РС-линкер может быть использован в качестве инструмента фиксации дезокси-нуклеотидных цепей на поверхности твердофазного носителя с последующим высвобождением их в раствор в условиях, которые не оказывают разрушающего влияния на биополимер. Разработанный нами подход позволяет повысить эффективность синтеза кДНК на мРНК гена α -цепи Т-клеточного рецептора отдельных клеток. Анализ лимфоцитарных репертуаров на уровне единичных клеток позволит напрямую связать последовательность варибельных фрагментов генов адаптивного иммунного ответа с функцией, выполняемой клеткой, а также получить новые данные о структуре и особенностях развития тканеспецифичных популяций лимфоцитов.

Вклад авторов. Козлов И.Б. – отработка методик олигонуклеотидного синтеза, написание статьи; Лебедин М.Ю. – разработка методов эмульсионной ПЦР; Гудима Г.О. – редактирование текста статьи; Сергеев И.В. – дизайн экспериментов; Кофиади И.А. – анализ данных.

■ Литература/References

1. Mardis E.R. Next-generation sequencing platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2013; 6 (1): 287–303. DOI: <https://www.doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
2. Mardis E.R. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat. Protoc.* 2017; 12 (2): 213–8. DOI: <https://www.doi.org/10.1038/nprot.2016.182>
3. Kosvyra A., Maramis C., Chouvarda I. Developing an integrated genomic profile for cancer patients with the use of NGS data. *Emerg. Sci. J.* 2019; 3 (3): 157–67. DOI: <https://www.doi.org/10.1186/s12935-021-01981-1>
4. Tang F., Barbacioru C., Nordman E., Li B., Xu N., Bashkurov V.I., et al. RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat. Protoc.* 2010; 5 (3): 516–35. DOI: <https://www.doi.org/10.1038/nprot.2009.236>
5. Eldar A., Elowitz M.B. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature.* 2010; 467 (7312): 167–73. DOI: <https://www.doi.org/10.1038/nature09326>
6. Frank N.Y., Schatton T., Frank M.H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J. Clin. Invest.* 2010; 120 (1): 41–50. DOI: <https://www.doi.org/10.1172/JCI41004>
7. Macosko E.Z., Basu A., Satija R., Nemesh J., Shekhar K., Goldman M., et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell.* 2015; 161 (5): 1202–14. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002>
8. Mikkelsen R.J.T., Grier K.E., Mortensen K.T., Nielsen T.E., Qvortrup K. Photolabile linkers for solid-phase synthesis. *ACS Comb. Sci.* 2018; 20 (7): 377–99. DOI: <https://www.doi.org/10.1021/acscmbosci.8b00028>
9. Scott P.J.H. *Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis.* Wiley, 2009: 343–89. DOI: <https://www.doi.org/10.1002/9780470749043.ch12>
10. Guillier F., Orain D., Bradley M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* 2000; 100: 2091–158. DOI: <https://www.doi.org/10.1021/cr980040+>
11. Amit B., Zehavi U., Patchornik A. Photosensitive protecting groups – a review. *Israel J. Chem.* 1974; 12 (1–2): 103–13. DOI: <https://www.doi.org/10.1002/IJCH.197400011>
12. Bamford C.H., Norrish R.G.W. 359. Primary photochemical reactions. Part VII. Photochemical decomposition of isovaleraldehyde

and di-n-propyl ketone. J. Chem. Soc. (Resumed). 1935: 1504–11. DOI: <https://www.doi.org/10.1039/JR9350001504>

13. Letsinger R.L., Kornet M.J., Mahadevan V., Jerina D.M. Reactions on polymer supports. J. Am. Chem. Soc. 1964; 86 (23): 5163–5. DOI: <https://www.doi.org/10.1021/ja01077a024>

14. Boymond L., Rottländer M., Cahiez G., Knochel P. Preparation of highly functionalized Grignard reagents by an iodine-magnesium exchange reaction and its application in solid-phase synthesis. Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37 (12): 1701–3. DOI: [https://www.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980703\)37:12<1701::AID-ANIE1701>3.0.CO;2-U](https://www.doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1701::AID-ANIE1701>3.0.CO;2-U)

15. Fields G.B., Noble R.L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. Int. J. Pept. Protein Res. 2009; 35 (3): 161–214. DOI: <https://www.doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x>

16. Rich D.H., Gurwara S.K. Removal of protected peptides from an ortho-nitrobenzyl resin by photolysis. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1973; 17: 610–1. DOI: <https://www.doi.org/10.1039/C39730000610>

17. Liu L., Kuang Y., Wang Z., Chen Y. A photocleavable peptide-tagged mass probe for chemical mapping of epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in human cancer cells. Chem. Sci. 2020; 11 (41): 11 298–306. DOI: <https://www.doi.org/10.1039/d0sc04481d>

18. Zhang B., Wang Y., Huang S., Sun J., Wang M., Ma W., et al. Photoswitchable CAR-T cell function in vitro and in vivo via a cleavable mediator. Cell Chem. Biol. 2021; 28 (1): 60–9.e7. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.10.004>

19. Williams R., Peisajovich S.G., Miller O.J., Magdassi S., Tawfik D.S., Griffiths A.D. Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. Nat. Methods. 2006; 3 (7): 545–50. DOI: <https://www.doi.org/10.1038/nmeth896>

20. Huang F., Shi Y. Synthesis of photolabile transcription initiators and preparation of photocleavable functional RNA by transcription. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012; 22 (13): 4254–8. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.028>

21. Yu H., Li J., Wu D., Qiu Z., Zhang Y. Chemistry and biological applications of photo-labile organic molecules. Chem. Soc. Rev. 2009; 39 (2): 464–73. DOI: <https://www.doi.org/10.1039/b901255a>

22. Leriche G., Chisholm L., Wagner A. Cleavable linkers in chemical biology. Bioorgan. Med. Chem. 2012; 20 (2): 571–82. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.048>

23. Wegner S.V., Sentürk O.I., Spatz J.P. Photocleavable linker for the patterning of bioactive molecules. Sci. Rep. 2015; 5 (1): 18309. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.048>

Сведения об авторах

Козлов Иван Борисович – науч. сотр. лаб. молекулярной иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: kozlov.nrcii@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1921-7715>

Лебедин Михаил Юрьевич – канд. биол. наук, науч. сотр. отдела геномики адаптивного иммунитета ФГБУН ИБХ им. акад. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: lebemih@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3877-7195>

Гудима Георгий Олегович – д-р биол. наук, зав. лаб. физиологии иммунитета и аллергии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: goudima@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2864-6949>

Сергеев Илья Викторович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: i.sergeev@dna-technology.ru

Кофиади Илья Андреевич – д-р биол. наук, зав. лаб. молекулярной иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: kofiadi@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-9280-8282>

Authors' information

Ivan B. Kozlov – Researcher of the Molecular Immunogenetics Lab. of NRC Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: kozlov.nrcii@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1921-7715>

Mikhail Yu. Lebedin – PhD, Researcher at Dept. of Genomics of Adaptive Immunity, Shemyakin-Ovchinnikov IBCH RAS, MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: lebemih@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3877-7195>

Georgii O. Gudima – Dr.Sci., PhD, Head of Physiology of Immunity and Allergy Lab. of NRC Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: goudima@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2864-6949>

Ilya V. Sergeev – PhD, Senior Researcher of Immunogenetics Dept. of NRC Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: i.sergeev@dna-technology.ru

Ilya A. Kofiadi – Dr.Sci., Head of Lab. of Molecular Immunogenetics of NRC Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: kofiadi@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-9280-8282>