

А.В.Степанов, Н.В.Майоров, Н.А.Осина, А.К.Никифоров

## ПУТИ ОПТИМИЗАЦИИ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Цель работы.** Изучение влияния активатора, окислителя и деблокирующего раствора на количественный выход олигонуклеотидов при производстве тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол». **Материалы и методы.** В качестве объекта исследований были выбраны праймеры ctx2 и ctx3, входящие в состав «Тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол». Для проведения исследований использовали экспериментальные составы растворов для деблокирования, активатора и окислителя и «стандартные» растворы, рекомендованные производителем ООО «Биоссет». Специфическую активность синтезированных праймеров ctx2 и ctx3 проверяли с использованием трех штаммов *V. cholerae* 569B, M-1298, 158 и *E. coli* 12226 O-55, готовили бактериальную суспензию возбудителей с конечной концентрацией  $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^1$  м.к./мл. ДНК выделяли методом нуклеосорбции в присутствии гуанидинизотиоцианата. **Результаты и вывод.** Показана возможность оптимизации производства генодиагностических препаратов путем увеличения выхода олигонуклеотидов при фосфорамидитном синтезе за счет использования в качестве деблокирующего раствора 3 % дихлоруксусной кислоты в дихлорметане и окислителя – 0,1 М раствор йода в уксусной кислоте и пиридине в соотношении 1:9. Применение таких реагентов увеличивает выход конечного продукта (праймеров) на 6 и 95 % соответственно. Использование усовершенствованной технологии синтеза позволит снизить затраты на дорогостоящие импортные реагенты и повысить количество выпускаемых генодиагностических препаратов для детекции особо опасных патогенов.

**Ключевые слова:** синтез олигонуклеотидов, деблокирование, активация, окисление.

Корреспондирующий автор: Степанов Андрей Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Stepanov, N.V.Mayorov, N.A.Osina, A.K.Nikiforov

## Approaches to Optimization of Oligonucleotide Synthesis during Manufacturing of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Objective** of the study is to investigate the impact of activator, oxidize, and unblocking solution on the quantitative yield of oligonucleotides during manufacturing of the test-system for *Vibrio cholerae* (ctxA+) DNA detection "GenChol", using polymerase chain reaction. **Materials and methods.** The subject of the study is ctx2 and ctx3 primers, incorporated in the test-system "GenChol". Utilized have been experimental formulations of solutions for unblocking, activator, and oxidizer and "standard" solutions, recommended by the manufacturer "BioSet" Ltd. Specific activity of the synthesized primers ctx2 and ctx3 has been evaluated on three different strains: *V. cholerae* 569B, M-1298, 158 and *E. coli* 12226 O-55. Bacterial suspension from the pathogen with final concentration of  $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^1$  m.c./ml has been produced. The DNA has been isolated applying nucleosorption in presence of guanidinium isothiocyanate. **Results and conclusions.** Demonstrated is the possibility of optimization of diagnostic preparation production via increment of oligonucleotide yield in the process of phosphoramidite synthesis, due to application of 3% dichloroacetic acid in dichloromethane as unblocking solution and oxidizer – 0.1 M iodine in acetic acid and pyridine in the ratio of 1:9. Utilization of such reagents increases the yield of the end product (primers) by 6 and 95 %, respectively. Enhanced technology for oligonucleotide synthesis will provide for the reduction of costs, associated with expensive imported reagents and the raise in the numbers of gene-diagnostic preparations for the detection of particularly dangerous pathogens.

**Key words:** oligonucleotide synthesis, unblocking, activation, oxidation.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Andrey V. Stepanov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Stepanov A.V., Mayorov N.V., Osina N.A., Nikiforov A.K. Approaches to Optimization of Oligonucleotide Synthesis during Manufacturing of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:90–94. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-90-94

Приоритетными задачами для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия Российской Федерации являются исследования, направленные на разработку новых высокоэффективных препаратов для лабораторной диагностики возбудителей особо опасных инфекций и совершенствование технологии их изготовления.

На сегодняшний день среди признанных методов лабораторной диагностики необходимо отметить полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Она позволяет в течение 2–4 ч детектировать ДНК (РНК) особо опасных патогенов и в настоящее время хорошо адаптирована к применению в Российских лабораториях

Своевременное обеспечение препаратами для генной индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций лабораторий территориального, регионального и федерального уровней, а также специализированных противоэпидемических формирований (СПЭБ) является мощным фактором в обеспечении биологической безопасности РФ и противодействии возможным проявлениям биологического терроризма.

С 2003 г. лаборатория генодиагностических препаратов РосНИПЧИ «Микроб» в рамках Межгосударственного центра по генной диагностике особо опасных инфекций производит зарегистрированные ПЦР-тест-системы и наборы реагентов для выявления ДНК чумы, холеры, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии.

Одним из важных компонентов генодиагностических препаратов являются олигонуклеотидные праймеры, представляющие собой химически синтезированные одноцепочечные фрагменты ДНК. В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» используется технология твердофазного фосфорамидитного синтеза, включающая несколько химических реакций, замкнутых в цикл: деблокирование, конденсация, кэппирование, окисление с последующим аммонолизом, необходимым для снятия олигонуклеотидов с полимерного носителя [3].

Необходимо отметить, что каждый этап синтеза и используемые в нем растворы оказывают существенное влияние на количество и качество конечного продукта [4]. Кроме того, сам процесс синтеза, используемое в нем оборудование и реагенты относятся к высоким технологиям и являются чрезвычайно затратными. В связи с этим представляется актуальным проведение работ по оптимизации каждого из этапов синтеза праймеров с целью увеличения выхода целевого продукта и снижения себестоимости производимого препарата.

Целью работы явилось изучение влияния активатора, окислителя и деблокирующего раствора на количественный выход олигонуклеотидов при производстве тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол».

### Материалы и методы

В качестве объекта исследований были выбраны праймеры ctx2 и ctx3, входящие в состав «Тест-систем для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол» (ФСР 2007/00100). Синтез олигонуклеотидов проводили в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом.

Для проведения исследований использовали экспериментальные составы растворов для деблокирования, активатора и окислителя и «стандартные» растворы, рекомендованные производителем ООО

«Биоссет». Состав каждого раствора представлен далее по тексту.

В качестве деблокирующих растворов применяли: № 1 (Dbl № 1) – 3 % трихлоруксусная кислота (Serva, Германия) в дихлорметане (Panreac, Испания); № 2 (Dbl № 2) – 3 % дихлоруксусная кислота (Sigma-Aldrich, США) в дихлорметане; № 3 (Dbl № 3) – 3 % дихлоруксусная кислота в 1,2-дихлорэтане (Panreac, Испания); № 4 (Dbl № 4) – 1 % трихлоруксусная кислота в дихлорметане.

В качестве активатора использовали растворы: № 1 (Act № 1) – 0,4 М 1-Н-тетразол (Биоссет, Россия) в ацетонитриле (Panreac, Испания); № 2 (Act № 2) – 0,25 М 5-этилтио-1-Н-тетразол (Биоссет, Россия) в ацетонитриле.

В качестве окислителя применяли растворы: № 1 (Oxd № 1) – 0,1 М йод (Экрос, Россия) в тетрагидрофуране (Panreac, Испания), пиридине (Нева Реактив, Россия) и воде в соотношении 8:1:1; раствор № 2 (Oxd № 2) – 0,1 М йод в ацетонитриле, пиридине и воде в соотношении 7:1:2; раствор № 3 (Oxd № 3) – смесь, состоящая из 0,1 М йода в уксусной кислоте (Экрос, Россия) и пиридине в соотношении 1:9.

Для проведения синтеза также использовали 0,05 М раствор амидофосфитных производных нуклеозидов (Glen Research, США) в ацетонитриле; кэппирующий раствор А, состоящий из уксусного ангидрида (Acros, США), 2,6-лутидина (Merck, Германия) и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; кэппирующий раствор Б, состоящий из 1-метилимидазола (Sigma-Aldrich, США), пиридина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8.

Уксусный ангидрид и пиридин очищали обычной перегонкой, дихлорметан, 1,2-дихлорэтан и ацетонитрил перегоняли над пентоксидом фосфора (Panreac, Испания).

Аммонолиз проводили с концентрированным водным раствором аммиака (НеваРеактив, Россия) в течение 12 ч при температуре 55 °С. Очистку синтезированных праймеров осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах (ChemGenes, США) в двухканальной системе OPS-201 (Биоссет, Россия). Затем олигонуклеотиды пересаждали 6 % раствором перхлората лития (Sigma-Aldrich, США) в ацетоне (Экрос, Россия), отмывали от солей ацетоном и подсушивали этоксиэтаном (Вектон, Россия).

Качество синтезированного продукта проверяли методом электрофореза в 20 % ПААГ в денатурирующих условиях с 7 М мочевиной. В качестве лидирующего красителя использовали смесь 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленцианола (Диа-М, Россия) в 95 % водном растворе формамида (Merck, Германия) с 0,01 М NaOH (Хеликон, Россия). Для окрашивания полос использовали 0,75 % Stains-all (Sigma-Aldrich, США) в 50 % водном растворе формамида.

Оптическую плотность олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически при 260 нм на при-

боре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и пересчитывали в пмоль/мкл с помощью формулы:

$$C = \frac{100 \cdot A_{260}}{1,54 \cdot nA + 0,75 \cdot nC + 1,17 \cdot nG + 0,92 \cdot nT}$$

где  $A_{260}$  – коэффициент поглощения при длине волн 260 нм, а nA, nC, nG, nT – количество оснований в нуклеотидной последовательности праймера.

Специфическую активность синтезированных праймеров ctx2 и ctx3 проверяли с использованием реагентов тест-системы «ГенХол». Исследования проводили с тремя штаммами *V. cholerae* 569B, M-1298, 158 и *E. coli* 12226 O-55. В соответствии с ТУ 8895-006-01898109-2007 готовили бактериальные суспензии возбудителей с конечной концентрацией  $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$  м.к./мл. ДНК выделяли методом нуклеосорбции в присутствии гуанидинизотиоцианата, проведение ПЦР и учет результатов – в соответствии с инструкцией к тест-системе. Результаты электрофореза документировали с помощью системы BioRad Gel Doc™ XR System (США). Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов [2].

### Результаты и обсуждение

Каждый этап синтеза и используемые в нем растворы оказывают существенное влияние на количество и качество олигонуклеотидов. Поэтому наши исследования были направлены на совершенствование состава растворов для деблокирования, активатора, окислителя с целью повышения количественного выхода праймеров.

В первой серии экспериментов изучали влияние деблокирующего раствора. На первом этапе синтеза, чтобы высвободить 5'-гидроксильную группу, удаляли димитокситритильную защиту. От числа свободных активных групп, зависит количество олигонуклеотидов, вступающих в реакцию конденсации. Для высокого выхода продукта необходимо чтобы эффективность удаления защитной группы в каждом цикле составляла 100 %. Однако во время удаления диметокситритильной защитной группы гликозидная связь пуриновых оснований гидролизует – происходит процесс депуринизации, который приводит к разрушению олигонуклеотида на стадии аммонолиза. Для предотвращения этого явления наши исследования были направлены на подбор условий деблокирования, снижающих депуринизацию и повышающих количество свободных активных групп.

Для определения влияния растворов для деблокирования на выход олигонуклеотидов в качестве «стандартного» использовали 3 % раствор трихлоруксусной кислоты в дихлорметане (Dbl № 1). В качестве «экспериментальных» изучали подобранные из литературных источников следующие растворы: 3 % дихлоруксусная кислота в дихлорметане [5] (Dbl

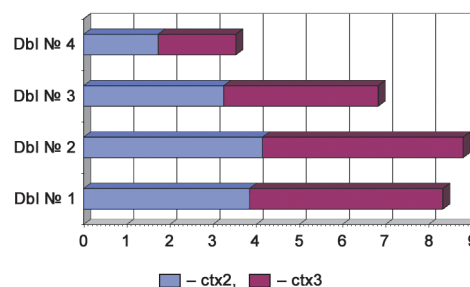


Рис. 1. Влияние деблокирующих растворов на выход праймеров. На оси абсцисс – суммарный выход праймеров ctx2 и ctx3 в оптических единицах (ОЕ), на оси ординат – используемые реагенты

№ 2); 3 % дихлоруксусная кислота в 1,2-дихлорэтано (Dbl № 3) [9]; 1 % трихлоруксусная кислота в дихлорметане (Dbl № 4) [6].

Изучение влияния деблокирующих растворов, а также растворов активатора и окислителя по сравнению со стандартной методикой проводили в условиях одинакового масштаба синтеза – 40 нмоль. Результаты изучения влияния деблокирующих растворов на выход олигонуклеотидов приведены на рис. 1.

Как видно из данных рис. 1, наименьший выход олигонуклеотидов 3,53 ОЕ по сравнению с контролем (Dbl № 1) отмечался при использовании 1 % раствора трихлоруксусной кислоты в дихлорметане (Dbl № 4). Средний показатель – 6,83 ОЕ был продемонстрирован в случае применения 3 % раствора дихлоруксусной кислоты в 1,2-дихлорэтано (Dbl № 3). Наибольший выход продукта – 8,8 ОЕ наблюдался при использовании 3 % раствора дихлоруксусной кислоты в дихлорметане (Dbl № 2).

Во второй серии экспериментов изучали влияние раствора активатора, обеспечивающего образование ковалентной связи 3'-фосфитной группы фосфорамидита с 5'-гидроксильной группой олигонуклеотида, присоединенного к носителю. От эффективности активирования фосфорамидита напрямую зависит реакция присоединения.

Для изучения влияния активатора на выход олигонуклеотидов в качестве «стандартного» использовали раствор в составе: 0,4 М 1-Н-тетразола в ацетонитриле (Act № 1). В качестве «экспериментального» применяли подобранный из литературных источников раствор, включающий 0,25 М 5-этилтио-1-Н-тетразола в ацетонитриле [1] (Act № 2). Всего было синтезировано 16 праймеров; из них 8 – ctx2 и 8 – ctx3, каждый из которых был охарактеризован количественно (по оптической плотности) и по специфической активности – в ПЦР. Количественный выход олигонуклеотидов (в ОЕ) представлен в таблице.

Влияние активатора на количественный выход олигонуклеотидов ctx2 и ctx3

Синтезируемый праймер	Активатор и выход продукта (M±m) ОЕ	
	Act № 1	Act № 2
ctx2	3±1,88	2,75±0,53
ctx3	3,78±1,33	3,75±1,06

Как следует из данных таблицы, использование «экспериментального» раствора активатора 5-этилтио-1-Н-тетразола не привело к повышению выхода продукта. При включении в синтез «стандартного» раствора активатора (1-Н-тетразола) выход праймеров ctx2 и ctx3 составил 3 и 3,75 ОЕ соответственно, а при использовании «экспериментального» раствора с 5-этилтио-1-Н-тетразолом – 2,75 и 3,75 ОЕ соответственно.

Полученные результаты указывают на возможность использования 0,25 М раствора 5-этилтио-1-Н-тетразола в ацетонитриле в качестве альтернативного активатора при проведении синтеза праймеров.

В третьей серии экспериментов изучали влияние раствора окислителя, который обеспечивал перевод фосфит триэфира (Р(III)), образовавшегося после присоединения основания, в более устойчивую форму – (Р(V)). Для этих целей используют растворы, содержащие йод. Эффективность окисления влияет на стабильность олигонуклеотида и, соответственно, от нее в значительной степени зависит выход конечного продукта.

Для оценки влияния окислителя на выход олигонуклеотидов использовали «стандартный» раствор Oxd № 1 в составе: 0,1 М йод в тетрагидрофуране, пиридине и воде в соотношении 8:1:1. В качестве «экспериментальных» изучали подобранные из литературных источников следующие растворы: Oxd № 2 – 0,1 М йод в ацетонитриле, пиридине и воде в соотношении 7:1:2 [7] и Oxd № 3 – 0,1 М йод в уксусной кислоте и пиридине в пропорции 1:9 [8]. Всего проведено 4 синтеза с одновременным использованием всех 8 каналов олигосинтезатора. Полученные данные выражали в виде суммарной величины, включающей общее количество праймеров ctx2 и ctx3 (рис. 2).

Как видно из представленных данных, использование «экспериментальных» растворов окислителя привело к повышению выхода синтезируемого продукта. Наибольшее значение – 14,1 ОЕ отмечалось в случае применения «экспериментального» раствора Oxd № 3. Несколько меньшая величина выхода (12,2 ОЕ) регистрировалась при использовании «экспериментального» раствора Oxd № 2. Введение

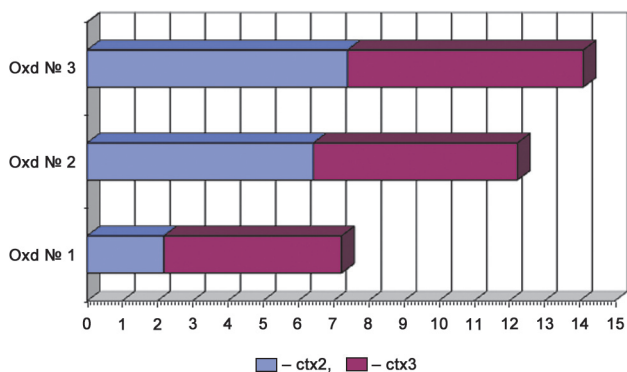


Рис. 2. Влияние растворов окислителя на выход праймеров. На оси абсцисс – суммарный выход праймеров ctx2 и ctx3 в оптических единицах (ОЕ); на оси ординат – изучаемые реагенты

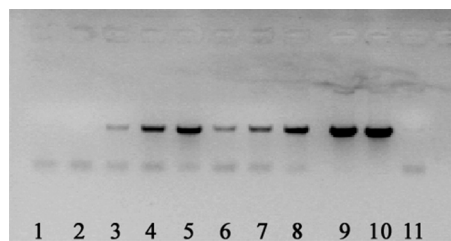


Рис. 3. Электрофореграмма результатов проверки тест-системы «ГенХол» с праймерами ctx2 и ctx3, синтезированными в соответствии с усовершенствованной технологией:

1 – *V. cholerae eltor* 158 (ctxA-) 1·10<sup>7</sup> м.к./мл; 2 – *E. coli* 12226 O-55 1·10<sup>7</sup> м. к./мл; 3–5 – *V. cholerae classica* 569В (ctxA+) 1·10<sup>1</sup> – 1·10<sup>3</sup> м. к./мл соответственно; 6–8 – *V. cholerae eltor* M-1298 (ctxA+) 1·10<sup>1</sup> – 1·10<sup>3</sup> м. к./мл; 9, 10 – препарат контрольной ДНК в концентрации 0,1 и 1 нг/мкл, 11 – отрицательный контроль

в синтез в качестве окислителя раствора Oxd № 3 позволило увеличить суммарный выход синтезируемого продукта на 95 % по сравнению со «стандартным» реактивом, а раствора Oxd № 2 – на 69 %.

На следующем этапе нашей работы праймеры ctx2 и ctx3, синтезированные с учетом усовершенствованной технологии (с деблокирующим раствором Dbl № 2, активатором Act № 2 и окислителем Oxd № 3), оценивали по чистоте и специфической активности. На электрофореграмме в ПААГ были выявлены полосы без признаков расщепления, что свидетельствовало о полноценной структуре синтезированных олигонуклеотидов и их чистоте. При определении специфической активности с реагентами тест-системы «ГенХол» установлено, что праймеры обеспечивали амплификацию ДНК холерных вибрионов при содержании в бактериальной суспензии от 1000 до 10 м.к./мл (рис. 3).

Результат ПЦР, приведенный на электрофореграмме (рис. 3), подтверждает соответствие праймеров, синтезированных по усовершенствованной технологии, требованиям качества, предъявляемым к препарату «ГенХол».

Таким образом, нами определены подходы, позволившие повысить выход олигонуклеотидных праймеров ctx2 и ctx3, входящих в состав тест-системы «ГенХол» при сохранении их аналитических и специфических свойств. Установлено, что использование 3 % раствора дихлоруксусной кислоты в дихлорметане на стадии деблокирования приводит к повышению выхода праймеров на 6 %; применение окислителя в составе 0,1 М йод в растворе уксусной кислоты и пиридина в пропорции 1:9 существенно увеличивает количественный выход олигонуклеотидов – на 95 %.

Продемонстрированная эффективность усовершенствованной схемы синтеза указывает на перспективность ее использования для оптимизации производства генодиагностических препаратов с целью увеличения объемов выпускаемой продукции и снижения затрат на дорогостоящие реагенты.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аралов А. В., Чахмахчева О. Г. Защитные группы в химическом синтезе олигорибонуклеотидов. *Биоорг. химия*. 2013; 39(1):3–25. DOI: 10.7868/S0132342313010028.

2. Гайдышев И. Анализ и обработка данных: специальный справочник. Санкт-Петербург: Питер; 2001. 752 с.

3. Beaucage S.L., Caruthers M.H. Deoxynucleoside phosphoramidites – A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981; 22(20):1859–62. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7.

4. Ellington A., Pollard Jr. J.D. Current Protocols in Molecular Biology. Unit 2.11 Synthesis and Purification of Oligonucleotides. 1998. P. 2.11.1–2.11.25. DOI: 10.1002/0471142727.mb0211s42.

5. Ferretti L., Karnik S.S., Khorana H.G., Nassal M., Oprian D.D. Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83:599–603. DOI: 10.1073/pnas.83.3.599.

6. Kaplan B.E., Itakura K. 2-DNA Synthesis on Solid Supports and Automation. In: Synthesis and Applications of DNA and RNA. Academic Press; 1987. P. 9–45. DOI: 10.1016/B978-0-12-514030-0.50007-4.

7. Song F., Krull U.J. Selectivity of hybridization controlled by the density of solid phase synthesized DNA probes on glass substrates. In: Optical waveguide sensing and imaging. Springer Science and Business Media; 2008. P. 195–210. DOI: 10.1007/978-1-4020-6952-9\_8.

8. Wang C., Trau D. A portable generic DNA bioassay system based on *in situ* oligonucleotide synthesis and hybridization detection. *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26(5):2436–41. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.028.

9. White H.A. Manual Oligonucleotide Synthesis Using the Phosphoramidite Method. New Nucleic Acid Techniques. *Methods Mol. Biol.* 1988; 4:193–213. DOI: 10.1385/0-89603-127-6:193.

References

1. Aralov A.B., Chakhmakhcheva O.G. [Protective groups in chemical oligoribonucleotide synthesis]. *Bioorg. Khimiya*. 2013; 39(1): 3–25. DOI:

10.7868/S0132342313010028.

2. Gaidyshev I. [Data Analysis and Processing: Specialized Reference-Book]. Saint Petersburg: "Piter"; 2001. 752 p.

3. Beaucage S.L., Caruthers M.H. Deoxynucleoside phosphoramidites – A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981; 22(20):1859–62. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7.

4. Ellington A., Pollard Jr. J.D. Current Protocols in Molecular Biology. Unit 2.11 Synthesis and Purification of Oligonucleotides. 1998. P. 2.11.1–2.11.25. DOI: 10.1002/0471142727.mb0211s42.

5. Ferretti L., Karnik S.S., Khorana H.G., Nassal M., Oprian D.D. Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83:599–603. DOI: 10.1073/pnas.83.3.599.

6. Kaplan B.E., Itakura K. 2-DNA Synthesis on Solid Supports and Automation. In: Synthesis and Applications of DNA and RNA. Academic Press; 1987. P. 9–45. DOI: 10.1016/B978-0-12-514030-0.50007-4.

7. Song F., Krull U.J. Selectivity of hybridization controlled by the density of solid phase synthesized DNA probes on glass substrates. In: Optical waveguide sensing and imaging. Springer Science and Business Media; 2008. P. 195–210. DOI: 10.1007/978-1-4020-6952-9\_8.

8. Wang C., Trau D. A portable generic DNA bioassay system based on *in situ* oligonucleotide synthesis and hybridization detection. *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26(5):2436–41. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.028.

9. White H.A. Manual Oligonucleotide Synthesis Using the Phosphoramidite Method. New Nucleic Acid Techniques. *Methods Mol. Biol.* 1988; 4:193–213. DOI: 10.1385/0-89603-127-6:193.

Authors:

Stepanov A.V., Mayorov N.V., Osina N.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Степанов А.В., Майоров Н.В., Осина Н.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 26.10.15.