

УДК 547-32

DOI: 10.18384/2310-7189-2017-3-51-60

СИНТЕЗ МАРКЕРА ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА: N¹-(P-ИЗОТИОЦИАНОТОБЕНЗИЛ)-ДИЭТИЛЕНТРИАМИН -N¹, N², N³, N³-ТЕТРАУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Пугачев Д.Е.^{1,2}, Осин Н.С.², Васильев Н.В.^{1,2}

¹ Московский государственный областной университет
105005, г. Москва, ул. Радио 10А, Российская Федерация

² Государственный научно-исследовательский институт
биологического приборостроения
125424, Волоколамское шоссе, 75, кор. 1, Москва, Российская Федерация

Аннотация. Предложена модифицированная схема получения широкораспространённого реагента для иммунофлуоресцентного анализа – изотиоцианатного производного диэтиленetriаминтетрауксусной кислоты. Оптимизированы отдельные стадии получения этого соединения, существенно повышен выход целевого продукта (до 70%). Разработанная схема позволяет не применять дополнительной стадии очистки изотиоцианатного производного при помощи препаративной хроматографии.

Ключевые слова: иммунофлуоресцентный анализ, изотиоцианат, производные диэтиленetriаминоуксусных кислот, лантанидный анализ, алкилирование, гидрирование.

MARKER SYNTHESIS FOR IMMUNOFLUORESCENT ANALYSIS: N¹-(P-ISOTHIOCYANATOBENZYL)-DIETHYLENETRIAMINE -N¹, N², N³, N³-TETRAACETIC ACID

D. Pugachov^{1,2}, N. Osin², N. Vasil'ev^{1,2}

¹ Moscow Region State University
10A, Radio Street, Moscow, 105005, Russian Federation

² State Research Institute of Biological Instrument-Making
Volokolamskoe shosse, 75, Moscow, 125424, Russia

Abstract. A modified scheme for preparation of a widely used reagent for immunofluorescence analysis, an isothiocyanate derivative of diethylenetriamine tetraacetic acid, is proposed. Certain stages of the compound preparation are optimized and the product yield is significantly increased (up to 70%). The developed scheme allows one not to apply an additional stage of the isothiocyanate derivative purification using preparative chromatography.

Key words: immunofluorescence analysis, isothiocyanat, derivatives of diethylenetriamine acetic acids, lanthanide analysis, alkylation, hydrogenation.

В настоящее время для специфического определения экологически обусловленных заболеваний, а также для идентификации врожденных патологий, в медико-биологической практике все чаще используются люминесцентные аналитические методы, основанные на реакциях биоспецифического связывания, так называемые методы иммунофлуоресцентного анализа [12]. Наиболее распространенной модификацией этого метода, хорошо зарекомендовавшей себя в массовом клиническом применении, является диссоциативно усиленный лантанидный флуоресцентный иммуноанализ с временным разрешением DELFIA™ (рис. 1), разработанная более трех десятков лет назад сотрудниками фирмы “Wallac” (Финляндия) [11; 8–10]. В течение ряда лет стандартные реагенты этой фирмы практически безальтернативно занимают отечественный рынок

медико-биологических услуг по экспресс-индикации и идентификации опасных биологических возбудителей, биогенных физиологически активных соединений, врожденных генетических заболеваний [2].

Технология DELFIA™ основана на перекомплексации ионов лантаноидов из конъюгатов биологических молекул с производными диэтилтриаминпентауксусной кислоты (ДТПА), образующей стабильный, но нелюминесцирующий комплекс, в другие комплексы, обладающие интенсивной люминесценцией, например, с нафтоилтрифторацетоном (НТА) [10]. В последние годы найдены и другие, более эффективные хелатирующие агенты для перекомплексообразования бензогетероциклического ряда [5; 6] и дибензогетероциклического рядов [3; 4; 14].

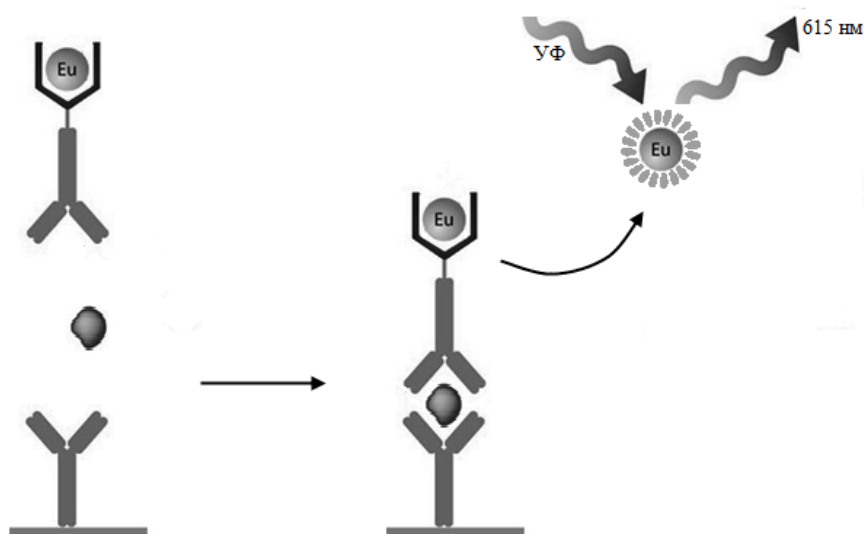


Рис. 1. Иммунофлуоресцентный анализ по технологии DELFIA

В качестве маркеров белков, удерживающих ион Eu^{3+} , могут применяться различные производные полиаминокислот (рис. 2), среди которых наиболее значимым является р-изотиоцианатобензилзамещенная диэтилентриаминотетрауксусная кислота (1)¹, известны также её симметричный

изомер (2), дихлортриазинилпроизводное (3) и углеродный изомер (4). Достаточно часто применяется ангидрид диэтилентриаминопентауксусной кислоты (5), который используется в этих методиках в большом избытке, что нередко приводит к снижению воспроизводимости результата анализа [8; 12].

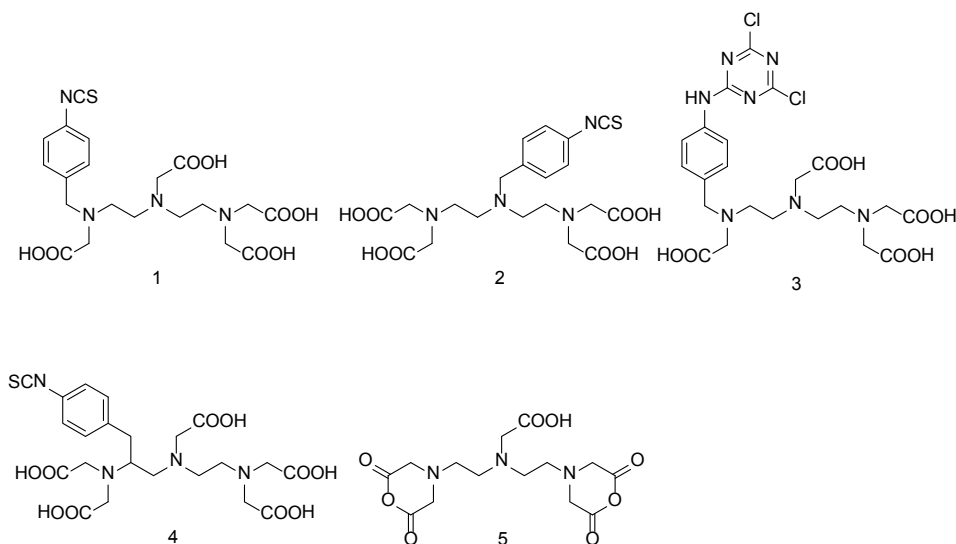


Рис. 2. Производные диэтилентриаминпентауксусной кислоты

В соединениях (1-4), присутствуют активные функциональные группы (изотиоцианатные, дихлортриазинильные), которые используются для “подшивки” маркера к амино-, тиоло- и окси-группам белков, что обеспечивает эффективное образование конъюгата. В случае диангирида (5) такой функциональной группой является ангидридная группа.

Изотиоцианат (1) является наиболее распространенным реагентом в методе DELFIA™. В нативной форме этот реагент, так же как и другие реа-

генты этого типа, не является доступным коммерческим реагентом, отсутствует в каталогах практически всех фирм-производителей аналитических реагентов для иммунофлуоресцентного анализа. Кроме этого, методики получения маркера (1), приведенные в различных источниках, плохо воспроизводятся. Таким образом, проведение доступного серийного иммунофлуоресцентного анализа в Российской Федерации осложнено в связи с низкой доступностью маркеров ряда диэтилентриаминокислот, и в настоящей работе представлен оптимизированный многостадийный метод получения соединения (1).

¹ Номер в скобках здесь и далее указывает числовое обозначение описываемого вещества или соединения на соответствующем рисунке.

Имеется достаточно большое количество работ, посвященных синтезу и применению изотиоцианата (1) и родственных соединений. Принципиальная схема получения (1) достаточно проста и базируется на диэтилентриамине как доступном исходном реагенте. На первой стадии (рис. 3) проводится введение нитробензильной группы, что приводит к образованию смеси изомеров (8) и (9) [8; 11], а также к продуктам двойного и тройного замещения (10, 11); при этом образование последних не обсуждалось в литературе.

Разделение изомеров (8) и (9) является приоритетной задачей, поскольку при проведении последующих стадий для получения соединения (1) требуются индивидуальные соединения. В соответствии с данными работы [11] соединение (8) достаточно сложно вы-

деляется из смеси изомеров (8) и (9) с использованием *o*-салицилового альдегида (образование оснований Шиффа, которые затем выкристаллизовываются из этанола, с последующей обработкой соляной кислотой).

Обсуждение результатов

Процесс алкилирования *n*-нитробензилбромидом проводился нами под хроматографическим контролем. При этом оказалось, что медленное прибавление *n*-нитробензилбромида к 6-кратному избытку диэтилентриамина приводит исключительно к образованию амина (8), который, после экстракции избытка диэтилентриамин концентрированным раствором хлорида натрия и упаривании растворителя, не нуждался в дополнительной очистке.

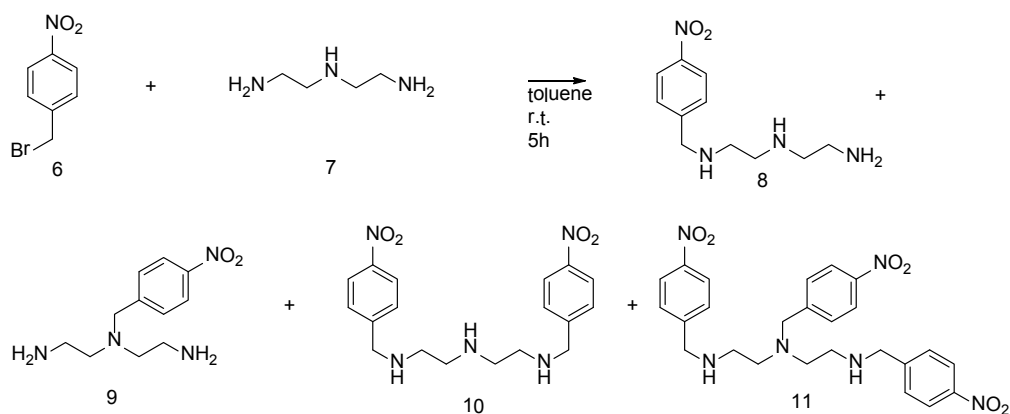


Рис. 3. Алкилирование диэтилентриамин

Амин (8), выделенный в виде желтого масла, подвергался алкилированию трет-бутиловым эфиром бромуксусной кислоты по методу, приведенному в работе [7]. Алкилирование проводилось в присутствии диизопропиламина и иодида калия в диметилформамиде;

во избежание побочных окислительных реакций, процесс проводился под атмосферой аргона (рис. 4). Продукт алкилирования (12) очищался колонной хроматографией на силикагеле и был выделен в виде светло-желтого масла с выходом 87%.

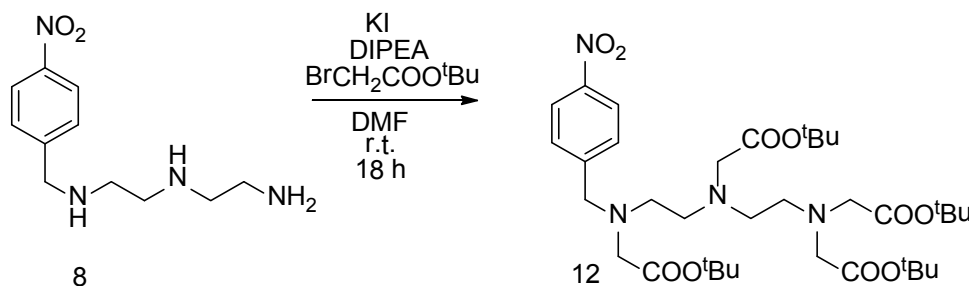


Рис. 4. Алкилирование трет-бутилбромацетатом

Трет-бутильная защитная группа в соединении (**12**) позволяет произвести восстановление нитрогруппы при помощи боргидрида натрия в присутствии палладия на углеводе (рис. 5). Эта методика, в сравнении с

гидрированием водородом под давлением, применявшимся ранее для этих синтезов [8-11], проста в выполнении, выход получаемого амина (**13**) близок к количественному ($\geq 95\%$).

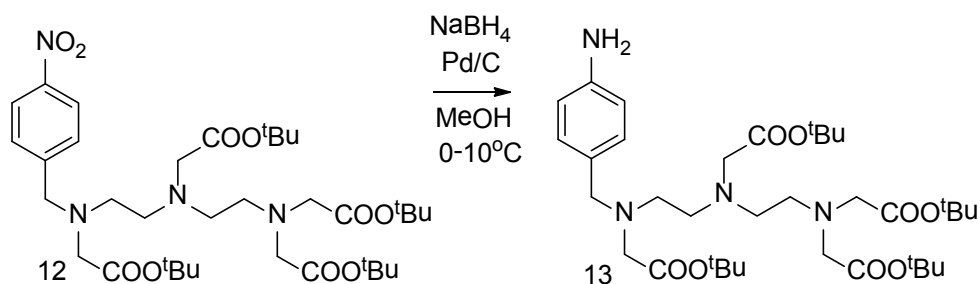


Рис. 5. Восстановление нитрогруппы

Стадия снятия трет-бутильной группы достаточно хорошо известна и отработана на многочисленных примерах (рис. 6). Для получения соединения (**14**) хорошо применима методика

[7; 13], в соответствии с которой при действии трифторуксусной кислоты на (**13**) удается выделить соответствующую тетрауксусную кислоту (**14**) с препаративным выходом ($\geq 95\%$).

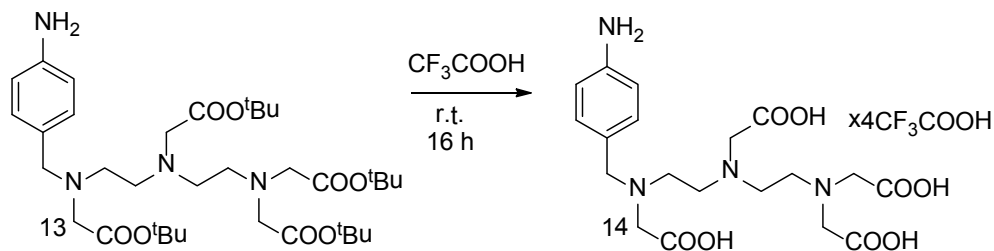


Рис. 6. Снятие трет-бутильной защитной группы

Стадия получения целевого изотиоцианата (1) реализуется достаточно эффективно при длительном действии тиофосгена в хлороформе на солянокислый

раствор соединения (14) (рис. 7). Выход изотиоцианата составляет $\approx 90\%$, контроль окончания реакции осуществляется при помощи нингидриновой пробы.

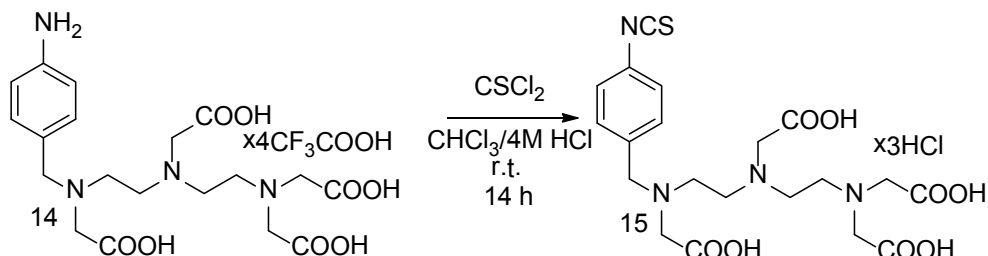


Рис. 7. Получение изотиоцианата

Судя по спектральным характеристикам и ВЭЖХ и по данным ЯМР ^1H , полученный изотиоцианат (15) имеет не менее 95% чистоты. Для практического применения реагента его возможно лиофилизовать в присутствии сахарозы.

Таким образом, в результате проведенного исследования разработана модифицированная схема получения изотиоцианатного производного(1)- N^1 -(*n*-изотиоцианатобензил)диэтилен триамин - $\text{N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3, \text{N}^3$ -тетрауксусной кислоты с суммарным выходом 70%. Методики отдельных стадий процессов значительно упрощены и имеют препаративную значимость, в частности, удалось избавиться от трудоёмких стадий хроматографического разделения полупродуктов реакции, а также и на конечной стадии выделения изотиоцианатного производного. Гидрирование нитропроизводного предложено проводить при помощи боргидрида натрия, что исключает работу с водородом под давлением, описанную в ранних работах.

Приложение: экспериментальная часть, оборудование и методы исследования

Спектры ЯМР ^1H растворов веществ в D_2O и CDCl_3 записаны на спектрометре JNM-ECX400 с рабочей частотой 400 МГц. Химические сдвиги приведены в м.д. относительно внешних эталонов: ТМС (^1H). Элементный анализ выполнен на приборе Perkin Elmer CHN PE 2400 SII. Индивидуальность соединений анализировалась при помощи HPLC на хроматографе Shimadzu LC-20 в изократическом режиме с подвижной фазой ацетонитрил/вода (40:60). Степень завершения реакции определяли при помощи тонкослойной хроматографии, используя пластины с силикагелем Merck 60 под УФ-лампой (254 нм).

В работе использовались нижеперечисленные коммерческие реагенты и растворители, приготовленные в соответствии с известными рекомендациями [1].

N^1 -(*n*-нитробензил)диэтилен триамин. К раствору 11.4 г диэтилен триамина (110.6 ммоль) в 50 мл толуола при комнатной температуре

медленно прибавляют (1 кап./5 сек.) раствор 4.0 г *n*-нитробензилбромида (18.5 ммоль) в 50 мл толуола. После прибавления смесь перемешивают 1 час, затем фильтруют и промывают осадок толуолом. Упаривают толуол при пониженном давлении, растворяют густое жёлтое масло в хлороформе и промывают насыщенным раствором NaCl. Органическую фазу упаривают при пониженном давлении досуха. Выход 4.1 г (93%), светло-жёлтое масло. ЯМР ^1H (D_2O): 3.24 (м, 2H, CH_2); 3.34 (м, 2H, CH_2); 3.41 (уш.с, 4H, 2CH_2); 4.30 (с, 2H, CH_2); 7.57 (д, 2H, H фен., $J = 8.3$); 8.12 (д, 2H, H фен., $J = 8.3$). Найдено, %: C 55.79; H 8.08; N 23.09. $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$. Вычислено, %: C 55.44; H 7.61; N 23.51.

Тетра(трет-бутил)- N^1 -(*n*-нитробензил)диэтилентриамин- N^1 , N^2 , N^3 , N^3 -тетраацетат. Под аргоном смешивают 4.0 г соединения 3 (16.8 ммоль), 110 мл ДМФА и 19.8 г диизопропилэтиламина (153.8 ммоль), затем одной порцией добавляют 22.5 г третбутил бромацетата (115.4 ммоль) и 3.2 г KI (16.8 ммоль). Смесь из оранжевой становится желто-коричневой, наблюдается экзотермия. Реакционную массу оставляют перемешиваться на 18 часов при комнатной температуре. Затем максимально упаривают смесь на роторном испарителе при температуре бани не больше 35°C. К остатку добавляют 350 мл этилацетата и 300 мл воды. Органическую фазу отделяют и промывают 2Ч100 мл 5% NaCl и 2Ч50 мл H_2O . Сушат через сульфат и упаривают до образования коричневого масла. Масло растворяют в минимальном количестве смеси гексан:этилацетат (2:1) и очищают колоночной хроматографией на SiO_2 , используя в качестве элюента ту же смесь растворителей.

После концентрируют элюат под вакуумом. Выход 11.6 г (87 %), маслянистая жидкость соломенного цвета. ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.40-1.44 (м, 36H, 12CH_3); 2.78 (м, 8H, 4CH_2); 3.24 (уш.с, 4H, 2CH_2); 3.40 (уш.с, 4H, 2CH_2); 3.91 (уш. с, 2H, CH_2); 7.53 (д, 2H, H фен., $J = 8.3$); 8.22 (д, 2H, H фен., $J = 8.3$). Найдено, %: C 58.01; H 8.16; N 9.10. $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{10}$. Вычислено, %: C 58.29; H 7.89; N 8.77.

Тетра(трет-бутил)- N^1 -(*n*-аминобензил)диэтилентриамин- N^1 , N^2 , N^3 , N^3 -тетраацетат. К раствору 4.3 г соединения 4 (6.2 ммоль) в 70 мл MeOH, добавляют 0.2 г Pd/C(10%). При охлаждении, небольшими порциями вносят 0.8 г NaBH_4 (21.1 ммоль). Каждую следующую порцию вносят после прекращения выделения водорода от предыдущей. После добавления всего NaBH_4 , смесь перемешивают 40 минут, затем фильтруют через целит, промывают метанолом и упаривают при пониженном давлении. Растворяют остаток в 170 мл этилацетата и перемешивают 30 минут с 60 мл 2 % HCl. Отделяют органический слой, промывают 3% раствором K_2CO_3 и водой, сушат через сульфат и упаривают до получения 4.1 г маслянистой жидкости соломенного цвета (98 %). ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.40-1.44 (м, 36H, 12CH_3); 2.80 (уш. с, 8H, 4CH_2); 3.25 (уш.с, 4H, 2CH_2); 3.39 (уш.с, 4H, 2CH_2); 3.75 (уш. с, 2H, $-\text{CH}_2$); 6.59 (д, 2H, H фен., $J = 8.3$); 7.08 (д, 2H, H фен., $J = 8.3$). Найдено, %: C 60.21; H 7.99; N 8.77. $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8$. Вычислено, %: C 61.16; H 8.61; N 9.20.

N^1 -(*n*-аминобензил)диэтилентриамин- N^1 , N^2 , N^3 , N^3 -тетрауксусная кислота. К 4.1 г соединения 5 добавляют 40 мл CF_3COOH и перемешивают при комнатной температуре 16 часов. Затем смесь упаривают до образования коричневого масла.

ривают при пониженном давлении, соупаривают 7 раз с метанолом, сушат твердый осадок при комнатной температуре при давлении 0.5 Торр. Светло-серый осадок, 5.3 г (~ 99 %). ЯМР ^1H : 1.94 (с, 8H, CH_2); 2.50-2.80 (м, 8H, CH_2); 3.90 (с, 2H, CH_2); 6.83 (д, 2H, H фен., J = 8.3); 7.25 (д, 2H, H фен., J = 8.3). Найдено, %: C 36.17; H 3.60; N 6.25. $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{F}_{12}\text{N}_4\text{O}_{16}$. Вычислено, %: C 36.41; H 3.90; N 6.40.

***N*¹-(*n*-изотиоцианатобензил) диэтиленстриамин-*N*¹, *N*², *N*³, *N*³-тетрауксусная кислота.** К раствору 1.5 г соединения (6) (1.7 ммоль) в 55 мл 4M HCl добавляют 0.3 г тиофосгена (2.6 ммоль) в 30 мл CHCl_3 . Перемешивают

14 часов при комнатной температуре. Окончание реакции проверяют по нингидриновой пробе. Упаривают реакцию смесь при пониженном давлении и температуре бани не более 30°C до минимального объема. Далее высаживают соединение 7 ацетонитрилом. Промывают осадок после фильтрации 2Ч20 мл ацетонитрила, 15 мл гексана и сушат под вакуумом. Белый порошок, 0.9 г (90 %). ЯМР ^1H (D_2O): 1.95 (с, 8H, CH_2); 2.50-2.80 (м, 8H, CH_2); 3.87 (с, 2H, CH_2); 7.46 (д, 2H, H фен., J = 8.3); 8.12 (д, 2H, H фен., J = 8.3). Найдено, %: C 40.95; H 5.14; N 9.47. $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$. Вычислено, %: C 40.58; H 4.94; N 9.37.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. 571 с.
2. Злобин В.Н., Осин Н.С. Проблемы биологической безопасности на пороге XXI века // Вестник Российской академии медицинских наук. 1999. № 8. С. 8–15.
3. Кострюкова Т.С., Ивановская Н.П., Затонский Г.В., Осин Н.С., Васильев Н.В. Маркер для иммунофлуоресцентного анализа на основе комплексов европия с фторированным β -дикетоном ряда карбазола // Биоорганическая химия. 2015. № 41 (2). С. 212–217.
4. Кострюкова Т.С., Ивановская Н.П., Лямин А.И., Романов Д.В., Осин, Н.С., Затонский Г.В., Васильев Н.В. Синтез и люминесцентно-спектральные свойства фторированных бензогетероциклических бета-дикетонов и их комплексов с европием // Журнал общей химии. 2012. № 3. С. 462–467.
5. Романов Д.В., Лямин А.И., Ивановская Н.П., Жедулов А. Е., Осин Н.С., Васильев Н.В. Комплексообразующие бензосодержащие гетероциклические соединения, содержащие β -дикарбонильный заместитель с фторированными радикалами [Патент РФ № 2373200 (2009)].
6. Романов Д.В., Лямин А.И., Ивановская Н.П., Моисеев С.В., Жедулов А.Е., Осин Н.С., Васильев Н.В. Комплексообразующие дибензосодержащие пятичленные циклические соединения, содержащие два симметричных бета-дикарбонильных заместителя с фторированными радикалами [Патент РФ № 2296756 (2007)].
7. Corson D.T., Meares C.F. Efficient multigram synthesis of the bifunctional chelating agent (S)-1-p-isothiocyanatobenzyl-diethylenetetraminepentaacetic acid // Bioconjugate Chemistry. 2000. № 11. P. 292–299.
8. Hemmild I., Dakubu S. Fluorescence spectroscopic determination of a biologically active substance [Sweden Patent No. 8102753 и Eur. Patent appl. No. 64486 (1982)].
9. Hemmild I. Luminescent lanthanide chelates – a way to more sensitive diagnostic methods // J. of Alloys and Compounds. 1995. № 225. P. 480–485.
10. Hemmild I., Dakubu S., Mukkala V.-M., Siitari H., Lyygрен T. Europium as a label in Time-Resolved immunofluorometric assays // Analytical Biochemistry. 1984. № 137. P. 335–343.

11. Mukkala V.M., Mikola H., Hemmilä I. The synthesis and use of activated N-benzyl derivatives of diethylenetriaminetetraacetic acids: alternative reagents for labeling of antibodies with metal ions // *Analytical Biochemistry*. 1989. № 176. P. 319–325.
12. Osin N.S., Pomelova V.G. // *Frontiers in Research. Humana Press*. 2008. №. 24 (1). P. 233–240.
13. Potman R.P., Janssen N.J.M.L., Scheeren J.W., Nivard R.F.J. // *J. Org. Chem.* 1984. № 49. P. 3628–3634.
14. Yuan J., Matsumoto K. Synthesis of a new tetradentate β -diketonate-europium chelate and its application for time-resolved fluorimetry of albumin // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997. № 15. P. 1397–1403.

REFERENCES

1. Gordon A.J., Ford R.A. The chemist's companion: A handbook of practical data, techniques, and references. New York, John Wiley and Sons, 1972. 537 p.
2. Zlobin V.N., Osin N.S. Problemy biologicheskoi bezopasnosti na poroge XXI veka [Problems of biological security in the XXI century]. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*, 1999, no. 8, pp. 8–15.
3. Marker dlya immunofluorestsennogo analiza na osnove kompleksov evropiya s ftorirovannyim β -diketonom ryada karbazola [Marker for immunofluorescence-based analysis of europium complexes with fluorinated β -diketone of a number of carbazole], Kostryukova T.S., Ivanovskaya N.P., Zatonskii G.V., Osin N.S., Vasil'ev N.V. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 2015, no. 41 (2), pp. 212–217.
4. Sintez i lyuminescentno-spektral'nye svoystva ftorirovannykh benzogeterotsiklicheskiikh beta-diketonov i ikh kompleksov s evropiem [Synthesis and luminescence-spectral properties benzoheterocycles fluorinated beta-diketones and their complexes with europium], Kostryukova T.S., Ivanovskaya N.P., Lyamin A.I., Romanov D.V., Osin N.S., Zatonskii G.V., Vasil'ev N.V. *Zhurnal obshchei khimii*, 2012, no. 3, pp. 462–467.
5. Romanov D.V., Lyamin A.I., Ivanovskaya N.P., Zhedulov A. E., Osin N.S., Vasil'ev N.V. Petrol-based complexing heterocyclic compounds containing β -dicarbonyl complexes with fluorinated radicals [RF Patent 2373200 (2009)].
6. Complexing dibenzosuberane five-membered cyclic compounds comprising two symmetric beta-dicarbonyl complexes with fluorinated radicals [RF Patent 2296756 (2007)]. Romanov D.V., Lyamin A.I., Ivanovskaya N.P., Moiseev S.V., Zhedulov A.E., Osin N.S., Vasil'ev N.V.
7. Corson D.T., Meares C.F. Efficient multigram synthesis of the bifunctional chelating agent (S)-1-p-isothiocyanatobenzyl-diethylenetetraminepentaacetic acid. *Bioconjugate Chemistry*, 2000, no 11, pp. 292–299.
8. Hemmilä I., Dakubu S. Fluorescence spectroscopic determination of a biologically active substance [Sweden Patent No. 8102753 и Eur. Patent appl. No. 64486 (1982)].
9. Hemmilä I. Luminescent lanthanide chelates – a way to more sensitive diagnostic methods. *J. of Alloys and Compounds*, 1995, vol. 225, pp. 480–485.
10. Hemmilä I., Dakubu S., Mukkala V.-M., Siitari H., Lövgren T. Europium as a label in Time-Resolved immunofluorometric assays. *Analytical Biochemistry*, 1984, vol. 137, pp. 335–343.
11. Mukkala V.M., Mikola H., Hemmilä I. The synthesis and use of activated N-benzyl derivatives of diethylenetriaminetetraacetic acids: alternative reagents for labeling of antibodies with metal ions. *Analytical Biochemistry*, 1989, no 176, pp. 319–325.
12. Osin N.S., Pomelova V.G. *Frontiers in Research. Humana Press*, 2008, vol. 24 (no 1), pp. 233–240.
13. Potman R.P., Janssen N.J.M.L., Scheeren J.W., Nivard R.F.J. *J. Org. Chem.*, 1984, vol. 49, pp. 3628–3634.

14. Yuan J., Matsumoto K. Synthesis of a new tetradentate β -diketonate-europium chelate and its application for time-resolved fluorimetry of albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, vol. 15, pp. 1397–1403.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Пугачёв Дмитрий Евгеньевич – аспирант кафедры теоретической и прикладной химии Московского государственного областного университета, младший научный сотрудник Государственного научно-исследовательского института биологического приборостроения;
e-mail: pugachovdmitry@gmail.com

Осин Николай Сергеевич – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, начальник отдела биологического микроанализа Государственного научно-исследовательского института биологического приборостроения;
e-mail: n.osin@immunoscreen.ru

Васильев Николай Валентинович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой теоретической и прикладной химии Московского государственного областного университета, ведущий научный сотрудник Государственного научно-исследовательского института биологического приборостроения;
e-mail: nikolai-vasilev@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dmitry E. Pugachov – postgraduate student of the Theoretical and Applied Chemistry Department at the Moscow Region State University, Junior Researcher, State Research Institute of Biological Instrument-Making;
e-mail: pugachovdmitry@gmail.com

Nikolai S. Osin – Doctor in Biological Sciences, senior researcher, Head of the Biological Microanalysis Department at the State Research Institute of Biological Instrument-Making;
e-mail: n.osin@immunoscreen.ru;

Nikolai V. Vasilev – Doctor in Chemical Sciences, professor, Head of the Department of Theoretical and Applied Chemistry at the Moscow Region State University, Leading Researcher, State Research Institute of Biological Instrument-Making;
e-mail: nikolai-vasilev@mail.ru

ПРАВИЛЬНАЯ ССЫЛКА НА СТАТЬЮ

Пугачев Д.Е., Осин Н.С., Васильев Н.В. Синтез маркера для иммунофлуоресцентного анализа: N¹-(п-изотиоцианатобензил)-диэтилен триамин-N¹, N², N³, N³-тетрауксусной кислоты // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2017. № 3. С. 51–60.
DOI: 10.18384/2310-7189-2017-3-51-60

THE CORRECT REFERENCE TO ARTICLE

D. Pugachov, N. Osin, N. Vasilev. Marker Synthesis for Immunofluorescent Analysis: N¹-(p-Isothiocyanatobenzyl)-Diethylenetriamine-N¹, N², N³, N³-Tetraacetic Acid. In: *Bulletin of Moscow Region State University*. Series: Natural Sciences, 2017, no. 3, pp. 51–60.
DOI: 10.18384/2310-7189-2017-3-51-60