

## Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 8. Вивчення ціанінових барвників як флюоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот

С. М. Ярмолюк

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Вивчено 19 поліметинових ціанінових барвників із різними гетероциклами як можливих флюоресцентних зондів для гомогенної детекції нуклеїнових кислот у розчині. Досліджено спектрально-люмінесцентні властивості вільних барвників, у присутності білка, а також їхніх комплексів з ДНК і РНК. Було запропоновано модель «в'язкого оточення» для пояснення зростання інтенсивності флюоресценції ціанінових барвників у їхніх комплексах з нуклеїновими кислотами.*

Вступ. Протягом останніх років ціанінові барвники інтенсивно досліджуються як перспективні флюоресцентні зонди для детекції одно- і двоспиральних ДНК та РНК в агарозних гелях [1]; кількісного визначення нуклеїнових кислот у розчині [2]; високочутливої детекції ДНК з застосуванням цитометрії в потоці [3]. Ціаніни були також застосовані в ряді оригінальних робіт для дослідження білків, які специфічно зв'язуються з нуклеїновими кислотами [4]; для вивчення статичних і динамічних властивостей окремих молекул ДНК [5]. Застосування монометинового ціанінового барвника SYBR Green I в умовах капілярного електрофорезу з лазер-індукованою флюоресцентною детекцією дозволило досягти 80 fg чутливості детекції ДНК (240 змоль 200 п. о. фрагмента) [6].

Монометинові ціанінові барвники мають слабку власну флюоресценцію у водних розчинах, але при взаємодії з нуклеїновими кислотами інтенсивність їхньої флюоресценції підвищується в декілька сотень разів [7]. Поряд з цим ці барвники характеризуються великими молярними коефіцієнтами екстинкції ( $> 50000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) у видимій області спектра; значними константами зв'язування з нуклеїновими кислотами поряд з практично неіс-

нуючою афінністю до інших біополімерів; відсутністю специфічності у взаємодії з певним типом нуклеотидної послідовності; наявністю великої лінійної ділянки в залежності інтенсивності флюоресценції комплексу від концентрації нуклеїнової кислоти. До цього класу барвників належить ряд високочутливих флюоресцентних зондів з комерційною назвою TO, TOTO, YO, YOYO, BOBO, POPO, SYTO, SYBR, які досить поширені в лабораторній практиці [8].

Загальнопринятим є твердження, що ефект підвищення інтенсивності флюоресценції досягається за рахунок інтеркаляції барвника в подвійну спіраль з наступною його «жорсткою» фіксацією у вигляді *trans*-ізомера [9, 10] в міжнуклеотидному просторі. Згідно з цим між молекулами нуклеїнової кислоти та барвником повинна бути певна структурна відповідність для утворення флюоресцентного комплексу лише з одним ізомером з двох існуючих. Можливо, це зумовлює мале число гетероциклічних основ, що застосовуються для синтезу монометинових ціанінів (бензгіазоловий, оксазоловий, піридиновий та хіноліновий гетероцикли).

Нещодавно в нашій лабораторії розпочато програму скринінгу різноманітних ціанінових барвників як можливих флюоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот. У результаті першого

скринінгу нами було запропоновано ряд нових ціанінів для детекції нуклеїнових кислот з метиле-ноксисбензтіазоловим і 2,5-диметилпіридиновим гетероциклами [10]. Запропоновані барвники мають перспективні флюоресцентні властивості для синтезу на їхній основі нових флюоресцентних зондів для визначення нуклеїнових кислот.

У даній роботі представлено результати скринінгу наступної серії ціанінових барвників з різною хімічною структурою та довжиною поліметинового ланцюга. Було вивчено флюоресцентні властивості як вільних барвників, так і їхніх комплексів з ДНК, РНК та білком.

**Матеріали і методи. Спектроскопічні виміри.** Спектри абсорбції було одержано з використанням спектрофотометра Spеcord M-40 (Німеччина). Абсорбційні спектри записували зразу ж після приготування розчинів барвників у відповідних розчинниках: 50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, або ДМФА.

Для запису спектрів флюоресценції використано флюоресцентний спектрофотометр Hitachi Model 850 (Японія). Флюоресцентні виміри здійснювали в термостабільній кварцевій кюветі (1 × 1 см). Флюоресценцію збуджували за допомогою випромінювання ксенонової лампи (150 Вт).

**Приготування запасних розчинів нуклеїнових кислот, барвників та білка.** Запасні розчини барвників ( $2 \cdot 10^{-3}$  М) готували, розчинюючи останні в ДМФА, де вони були стабільними протягом декількох місяців на противагу водним розчинам, у яких спостерігалася різка втрата флюоресцентних властивостей барвників. Робочі розчини барвників готували безпосередньо перед застосуванням. Для спектральних досліджень використовували тотальну тимусну ДНК телят і тотальну дріжджову РНК («Sigma», США). Запасні розчини нуклеїнових кислот готували в Т-буфері (трис-НСІ, 50 мМ, рН 7,5) з концентраціями  $6,1 \cdot 10^{-3}$  п. о. для ДНК і  $2,4 \cdot 10^{-2}$  п. о. для РНК. Концентрація запасного розчину альбуміну сироватки бика (BSA) була 1 мг/мл.

**Спектри поглинання та флюоресценції.** Робочі розчини комплексів барвників з нуклеїновими кислотами готували безпосередньо перед вимірюванням, змішуючи стокові розчини барвника та нуклеїнової кислоти в трис-НСІ-буфері (50 мМ, рН 7,5). Кінцеві концентрації ДНК та РНК були  $1,2 \cdot 10^{-4}$  та  $2,0 \cdot 10^{-4}$  мМ відповідно. Кінцева концентрація барвників була 0,02 мМ. Комплекси барвників з нуклеїновими кислотами готували у співвідношенні: 1 барвник на 10 п. о. для РНК і на 6 п. о. для ДНК. Спектральні властивості вільних барвників вивчали при тих же концентраціях. Використовували робочі розчини білка з високою концентрацією (1 мг/мл).

**Результати і обговорення. Хімічна структура та спектроскопічні властивості вільних барвників.** Основні характеристики спектрів поглинання та флюоресценції 19 ціанінових барвників представлені в табл. 1. Слід відмітити, що флюоресцентні властивості зазначених барвників раніше не вивчалися. ТО, широкоживаний ціаніновий барвник для детекції нуклеїнових кислот [7], використаний в цій роботі для порівняння.

Зміна полярності середовища істотно не впливала на положення максимуму адсорбції ( ${}^{\text{mol}}\lambda_{\text{max}}$ ) вільних барвників. При переході від полярного водного буфера до малополярного ДМФА в більшості барвників колір стає інтенсивнішим, а різниця в максимумах поглинання між розчином в ДМФА та в буфері ( $\Delta {}^{\text{mol}}\lambda_{\text{max}}$ ) складає 1–20 нм. У деяких барвників (6К, 17К, 4К, 15К) спостерігається зворотна сольватохромія ( $\Delta {}^{\text{mol}}\lambda_{\text{max}} = -5 \div -30$ ).

Майже половина всіх використаних барвників має схильність до утворення агрегатів, які були охарактеризовані власними максимумами поглинання ( ${}^{\text{agr}}\lambda_{\text{max}}$ ) та співвідношенням інтенсивностей молекулярної та агрегаційної смуг ( ${}^{\text{mol}}D/{}^{\text{agr}}D$ ). У переважній більшості агрегаційні максимуми гіпсометрично зсунуті відносно молекулярних максимумів, що дає підставу стверджувати про Н-агрегаційну природу утворених агрегатів. Проте два барвники (13К та 17К) мають поряд з Н-агрегатами батохромно зсунуті максимуми, можливо, J-агрегаційної природи. Найбільшу схильність до агрегації мають барвники 17К, 8К, 1К, 4К, 15К та 22К, для яких  ${}^{\text{mol}}D/{}^{\text{agr}}D$  у водному буфері лежить в межах 0,41–0,75. При переході до менш полярного ДМФА рівень агрегації цих барвників різко знижується ( ${}^{\text{mol}}D/{}^{\text{agr}}D > 1$ ).

Всі вивчені барвники характеризуються низьким рівнем інтенсивності власної флюоресценції ( $I_0$ ). Практично для всіх ціанінів, за винятком 19К, вона не перевищує одиниці. Криві смуг флюоресценції широкі, без чітко окресленого максимуму. Через те для деяких барвників (10К, 11К, 12К, 1К, 14К, 22К і ТО) було важко визначити положення максимуму флюоресценції ( ${}^{\text{em}}\lambda_{\text{max}}$ ), величину стоксового зсуву ( $\Delta S$ ).

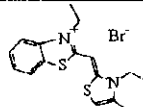
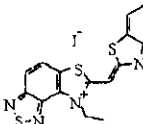
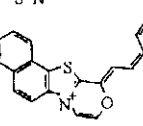
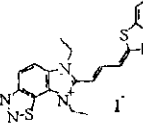
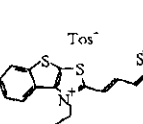
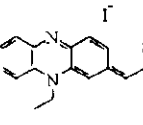
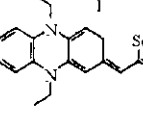
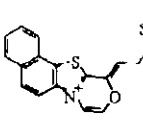
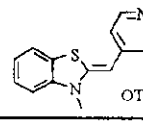
**Спектральні властивості комплексів барвників з нуклеїновими кислотами** представлені в табл. 2. Всі ціаніни, які були використані в цій роботі, належать до катіонних барвників. Отже, на погляд автора, всі вони певним чином повинні взаємодіяти з негативно зарядженими нуклеїновими кислотами, що може супроводжуватися змінами в спектральних властивостях барвників.

Винятком можуть бути барвники 12К, 7К, 17К, для яких присутність нуклеїнової кислоти не

Таблиця 1  
Хімічні структури та спектральні властивості ціанінових барвників

Умовна назва барвника	Хімічна структура барвника	Адсорбція в ДМФА			Адсорбція у водному буфері				Фл. $\lambda_{\text{max}}$ , нм
		$\text{agr}_{\lambda_{\text{max}}}$ , нм	$\text{mol}_{\lambda_{\text{max}}}$ , нм	$\text{mol}_{\lambda_{\text{max}}}/\text{agr}_{\lambda_{\text{max}}}$	$\text{agr}_{\lambda_{\text{max}}}$ , нм	$\text{mol}_{\lambda_{\text{max}}}$ , нм	$\text{mol}_{\lambda_{\text{max}}}/\text{agr}_{\lambda_{\text{max}}}$	$\Delta \text{mol}_{\lambda_{\text{max}}}$ , нм	
3K		—	560	—	—	555	—	5	595
10K		—	467	—	440	460	1.3	7	—
11K		—	460	—	—	453	—	7	—
12K		424	483	2	418	480	1.87	3	—
13K		493	520	1.42	540*	508	1.01	12	590, 630
7K		515	537	1.24	510	535	1.16	2	—
6K		—	495	—	735	508	0.91	—	530
16K		—	634	—	603	633	1.26	1	—
20K		407	424	1.34	397	425	1.88	4	490
19K		525	564	1.4	525	555	1	9	597
17K		535 620*	565	0.98	535 635*	570	0.75	-5	—

Закінчення табл. 1

Умовна назва барвника	Хімічна структура барвника	Адсорбція в ДМФА			Адсорбція у водному буфері				Флюоресценція		
		agr $\lambda_{\text{max}}$ , нм	mol $\lambda_{\text{max}}$ , нм	mol I / agr I	agr $\lambda_{\text{max}}$ , нм	mol $\lambda_{\text{max}}$ , нм	mol I / agr I	mol $\Delta\lambda_{\text{max}}$ , нм	em $\lambda_{\text{max}}$ , нм	*I <sub>0</sub>	$\Delta S$ , нм
8K		405	423	1,53	398	422	0,51	1	497	0,27	75
1K		420	445	1,1	408	440	0,75	5	—	0,05	—
21K		—	485	—	—	483	—	2	510	0,77	—
14K		509	535	2,6	—	528	—	7	—	0,05	—
4K		610	645	1,48	595	675	0,41	-30	—	—	—
5K		695	750	1,03	665	750	0,9	—	—	—	—
15K		700	755	1,03	680	760	0,59	-5	—	—	—
22K		575	610	2,5	550	590	0,66	20	—	0,4	—
TO		—	505	—	476	501	1,12	4	—	0,09	—

\*Батохромний зсув зазначених смуг по відношенню до молекулярних вказує на їхню можливу J-агрегаційну природу.

Таблиця 2

Спектральні характеристики комплексів ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами

Барвник	Комплекс барвника з ДНК					Комплекс барвника з РНК				
	abs. $\lambda_{\text{max}}$ , нм	em. $\lambda_{\text{max}}$ , нм	$\Delta S_{\text{DNA}}$ , нм	$^*I_{\text{DNA}}$	$\Delta Q_{\text{DNA}}$	abs. $\lambda_{\text{max}}$ , нм	em. $\lambda_{\text{max}}$ , нм	$\Delta S_{\text{DNA}}$ , нм	$^*I_{\text{DNA}}$	$\Delta Q_{\text{DNA}}$
3К	553	600	47	2,11	3,46	554	600	46	1,73	2,84
10К	462	548	86	0,36	17,86	463	545	82	0,53	26,4
11К	455	530	75	0,502	35,85	455	520	65	0,91	65,07
12К	490	—	—	—	—	480	—	—	—	—
13К	497	595; 630	98; 143	0,35; 0,38	0,61; 0,58	497	595; 635	98; 148	0,34; 0,28	0,59; 0,42
7К	535	—	—	—	—	535	—	—	—	—
6К	511	530	19	1,7	3	506	540	34	1,60	2,90
16К	636	—	—	—	—	636	—	—	—	—
20К	422	492	75	1,19	1,98	425	490	65	4,58	7,63
19К	540	—	—	—	—	580	605	25	3,80	1,75
17К	570	—	—	—	—	572	—	—	—	—
8К	420	495; 525	75; 105	2,82; 3	10,40; 11,10	423	495; 535	72; 112	5,40; 5,70	20,00; 21,10
1К	445	576; 640	131; 195	0,10; 0,13	2,00; 2,50	445	586	141	0,24	4,80
21К	486	510	24	0,75	0,97	485	510	25	0,78	1,01
14К	528	565	37	0,08	1,62	533	575	42	0,21	4,2
4К	650	—	—	—	—	655	—	—	—	—
5К	750	—	—	—	—	700	—	—	—	—
15К	760	—	—	—	—	774	—	—	—	—
22	611	636	22	2,26	5,65	619	640	21	2,09	5,23
ТО	505	532	28	16,78	186,00	505	537	32	19,54	217,10

\*Відносні одиниці.

впливає на спектральні властивості ціанінів, а також 16К, 4К, 5К, 15К, де спостерігаються зміни в положенні максимуму смуги поглинання барвника ( $^{\text{abs}}\lambda_{\text{max}}$ ) у присутності ДНК або ж РНК.

Барвники 3К, 10К, 11К, 13К, 6К, 20К, 19К, 8К, 1К, 21К, 14К, 22К і ТО «реагують» зміною своїх спектральних властивостей на присутність нуклеїнової кислоти в робочому розчині. По-перше, всі максимуми смуг поглинання комплексів відрізняються від таких вільних барвників. У більшості випадків вони батохромно зсунуті на 2—5 нм по відношенню до максимумів незв'язаних ціанінів. Позитивна сольватохромія може свідчити про те, що барвник у комплексі з нуклеїновою кислотою перебуває в менш полярному оточенні порівняно з його вільним станом. Незначна величина цих зсувів зумовлена як полярним характером барвників, так і полярною природою розчинника.

Додавання нуклеїнової кислоти до барвників помітно не зменшувало агрегації барвників (даних не наведено). Всі барвники, за винятком 13К, збільшують інтенсивність флюоресценції в комплексах ( $I_{\text{DNA}}, I_{\text{RNA}}$ ) порівняно з вільним станом. Відношення інтенсивностей флюоресценції зв'язаного і незв'язаного барвників ( $\Delta Q_{\text{DNA}}, \Delta Q_{\text{RNA}}$ ) лежить в межах від одиниці (21К) до 65 (10К). Стоксові зсуви флюоресценції ( $\Delta S_{\text{DNA}}, \Delta S_{\text{RNA}}$ ) також знаходяться в широкому інтервалі — від 19 (6К) до 86 нм (10К). Аномально високі токсівні зсуви (112—195 нм), що вираховані формально для комплексів барвників 13К, 8К, 1К, потребують додаткових досліджень для їхнього уточнення.

Спектральні властивості барвників у присутності БСА (табл. 3). У програмі випадкового скринінгу ціанінових барвників, застосованих у цій роботі, як можливих флюоресцентних зондів для

Таблиця 3  
Спектральні характеристики ціанінових барвників у присутності БСА

Барвник	Абсорбція		Флюоресценція			
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ , нм	$\Delta\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ , нм	$\Delta\lambda$ , нм	$I_{\text{PRO}}$	$I/I_0$
3K	554	-1	600	46	3,3	5,4
10K	460	0	600	140	0,24	12,0
11K	455	2	534	89	0,16	11,4
12K	490	10	576	86	0,07	—**
13K	508	0	590; 628	82; 120	3,87; 3,96	6,78; 6,00
7K	534	-1	595	61	0,27	—**
6K	508	0	532	24	6,2	11,2
16K	630	-3	663	36	7,13	—**
20K	420	-5	485	65	3,73	6,21
19K	568	13	600	32	17,9	8,24
17K	567	-3	590	23	2,94	—**
8K	418	-4	490	72	2,8	10,3
1K	440	0	580	140	0,13	2,60
21K	488	5	520	32	8,62	11,10
14K	533	5	557	24	32,4	648,0
4K	635	-40	—	—	—	—
5K	750	0	—	—	—	—
15K	760	0	—	—	—	—
22K	610	20	—	—	—	—
TO	503	-1	540	37	0,11	11,6

\*Умовні одиниці; \*\*вказані величини не можливо точно вирахувати, оскільки власна флюоресценція наближається до нуля

детекції нуклеїнових кислот здійснено також тестове визначення впливу присутності білка на спектральні властивості барвників. Це зумовлено наступними міркуваннями. По-перше, зазначений тест дає можливість оцінювати специфічність зв'язування барвників з нуклеїновими кислотами. По-друге, загальновідомо, що підвищення в'язкості оточуючого середовища в більшості випадків спричинює підвищення інтенсивності флюоресценції поліметинових барвників [13]. В наведених дослідках досить висока концентрація білка (1 мг/мл) надавала робочому розчину великої в'язкості. А це, в свою чергу, допомагало з'ясувати можливий внесок нуклеїнової кислоти як «в'язкого середовища» в загальне підвищення інтенсивності флюоресценції барвника в комплексі з нею.

Наявність білка в робочих розчинах не впливає

на спектральні властивості лише барвників 5K і 15K. Для решти барвників зміни спостерігаються в положенні максимуму смуги поглинання ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ ), в зростанні інтенсивності флюоресценції порівняно з вільним від білка розчином ( $I/I_0$ ). Різниця між максимумами поглинання сумішей барвників з білком та їхніми максимумами в буферному розчині ( $\Delta\lambda_{\text{abs}}$ ), на погляд автора, має випадковий характер і набуває як позитивних, так і негативних значень.

Рівень інтенсивності флюоресценції ( $I_{\text{PRO}}$ ) для більшості барвників у присутності білка більший, ніж у випадку їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами. Так, наприклад, барвники 12K, 7K, 16K і 17K мають значні величини інтенсивності флюоресценції на противагу відсутності флюоресценції у вільному стані (табл. 1) і в присутності нуклеїнових кислот (табл. 2). Лише TO та 11K

виявляють набагато сильніше зростання флюоресценції в комплексах з нуклеїновими кислотами порівняно з їхніми сумішами з білком. Так, наприклад, для 11К у випадку взаємодії з РНК величина  $\Delta Q_{\text{RNA}}$  складає 65,07, а у суміші з білком підвищення інтенсивності  $I/I_0$  дорівнює 11,4.

Карбоціанін 14К у присутності БСА показав досить високий рівень інтенсивності флюоресценції ( $I_{\text{PRO}} = 32,4$ ). Це в 648 разів перевищує рівень його власної флюоресценції. Відповідні величини для його комплексів з нуклеїновими кислотами приблизно на два порядки менші ( $I_{\text{RNA}} = 0,21$ ;  $\Delta Q_{\text{RNA}} = 4,2$ ).

Стоксові зсуви барвників у присутності білка лежать в інтервалі від 23 нм для 17К до 89 нм для 11К. Аномально великі величини стоксових зсувів 10К (140 нм), 13К (120 нм), 1К (120 нм) можуть бути зумовлені процесами агрегації у водних розчинах і потребують додаткових досліджень. Барвник 13К характеризується двома смугами флюоресценції ( ${}^{\text{em}}\lambda_{\text{max}} = 590$ ; 628 нм).

Хімічні структури всіх вивчених барвників підбирали згідно з інтеркаляційною моделлю взаємодії ціанінів з нуклеїновими кислотами. Відповідно до цього молекула барвника в утвореному комплексі з двоспіральною нуклеїною «вклинюється» повністю [14] або частково [10, 11] між сусідніми парами основ без порушення уотсон-кріківського спарювання. Практично всі використані структури «максимально плоскі» і не містять об'ємних замісників у гетероциклічних основах, які б утруднювали можливу інтеркаляцію. Досліджували як монометинові, так і диметинові барвники,  ${}^{\text{abs}}\lambda_{\text{max}}$  яких лежали в інтервалі від 423 (8К) до 755 нм (5К).

Спектрально-люмінесцентні властивості ціанінових барвників та їхніх можливих комплексів з нуклеїновими кислотами вивчали згідно з розробленою процедурою. Раніше було запропоновано також декілька емпіричних правил добору ціанінових барвників як флюоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот. За рідкісними винятками, хороші флюоресцентні зонди на основі ціанінів мають схильність до асоціації — утворення надмолекулярних структур у водному полярному буфері. Агрегати містять дві і більше молекул барвників, певним чином орієнтованих у просторі. Як правило, додавання нуклеїнової кислоти до флюоресцентного зонду диспергує асоціати, знижуючи агрегацію. Згідно з останнім, гетероциклічні основи не повинні містити аніонних замісників з негативним зарядом [12]

Більшість досліджених барвників (10К, 12К, 13К, 7К, 6К, 16К, 20К, 19К, 17К, 8К, 1К, 4К, 5К, 15К, 22К і ТО) утворюють агрегати у водному

розчині. Смуги поглинання агрегаційних структур ( ${}^{\text{agr}}\lambda_{\text{max}}$ ) розташовані переважно в короткохвильовій області по відношенню до молекулярної смуги. На цій підставі їх можна віднести до Н-агрегатів, флюоресценція яких заборонена. Деякі барвники (13К, 17К) мають смуги з батохромним по відношенню до молекулярної смуги зсувом, природа яких не зовсім зрозуміла. Це можуть бути флюоресцентні J-агрегати, а можуть бути і домішки інших люмінофорів, що утворилися під час хімічного синтезу. Додавання нуклеїнової кислоти не спричинювало суттєвих змін у спектрах абсорбції, помітно не зменшувало агрегації барвників.

У малополярному ДМФА тенденція до агрегації у барвників різко зменшується ( ${}^{\text{mol}}D/D^{\text{agr}} > 1$ ). Перехід від полярного середовища (буфер) до менш полярного (ДМФА) впливає також на положення максимумів смуг поглинання, батохромно зсуваючи їх на 1—20 нм (позитивна сольватохромія). Винятком є лише барвники 6К, 17К, 4К та 15К, що проявляють негативну сольватохромію. В комплексах з нуклеїновими кислотами переважна більшість барвників показує невелику, але все ж таки позитивну сольватохромію по відношенню до їхньої незв'язаної форми.

Зазначені вище барвники 17К, 4К та 15К, за винятком 6К, не флюоресціюють у присутності нуклеїнових кислот. Отже, в комплексі з нуклеїною кислотою барвник з «хорошими флюоресцентними властивостями» перебуває в більш неполярному середовищі порівняно з вільною його формою. При пошуку нових ціанінів — можливих флюоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот перевагу слід надавати, на погляд автора, барвникам з позитивною сольватохромією.

Усі вивчені барвники і ТО мають дуже слабкий рівень власної флюоресценції або ж взагалі не флюоресціюють (7К, 16К, 17К, 4К, 5К, 15К). При утворенні комплексів з нуклеїновими кислотами, а також в середовищі «в'язкого» білка спостерігається підвищення інтенсивності флюоресценції. В обох випадках (за винятком ТО і 14) — це величини одного порядку як за рівнем загальної інтенсивності ( $I_{\text{DNA}}$ ,  $I_{\text{RNA}}$ ,  $I_{\text{PRO}}$ ), так і за відносним рівнем підвищення флюоресценції ( $\Delta Q_{\text{DNA}}$ ,  $\Delta Q_{\text{RNA}}$  і  $I/I_0$ ).

Для пояснення можливого механізму «розпалювання» флюоресценції барвника в присутності білка можна застосувати давно відому для поліметинів модель «жорсткої матриці». З неї випливає, що білок як «в'язке» середовище утруднює ізомеризаційні та релаксаційні процеси в молекулі барвника, які розсіюють енергію, знижують величину квантового виходу [15]. Ця модель, на думку автора, досить добре пояснює незначне (на один

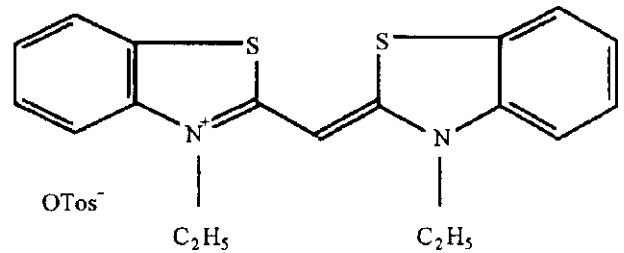
порядок) підвищення інтенсивності флюоресценції ціанінів у присутності «в'язких» білків.

Зрозуміло, що така модель не може бути застосована для пояснення трьохпорядкового підвищення інтенсивності флюоресценції монометинів у їхніх комплексах з нуклеїновими кислотами. В науковій літературі по взаємодії поліметинів з нуклеїновими кислотами описано так звані інтеркаляційні моделі, в яких барвник у результаті взаємодії жорстко фіксується між парами основ у формі *транс*-ізомера [10, 11, 14]. Загальноприйнято, що *транс*-ізомери ціанінових барвників мають кращі флюоресцентні властивості порівняно з їхніми *цис*-ізомерами [13]. Вплив нуклеїнової кислоти як «в'язкого» середовища на флюоресцентні властивості ціанінів у всіх цих моделях нехтується.

На погляд автора, працюють два механізми підвищення флюоресценції ціанінів у їхніх комплексах з нуклеїновими кислотами: перший — це незначне зростання за рахунок в'язкості природного полімеру і другий — різке підвищення внаслідок жорсткої фіксації в асиметричному середовищі нуклеїнової кислоти.

Дуже важливо, як здається те, що в реальних системах визначення нуклеїнових кислот застосовуються різноманітні робочі середовища (наприклад, агарозні гелі) і практично ніколи не враховується вплив їхньої в'язкості на чутливість детекції. Справа в тому, що в основі цього методу лежить так званий гомогенний принцип детекції з використанням надлишку зонда, що має незначну інтенсивність власної флюоресценції. Зрозуміло, що для такого методу має велике значення так зване співвідношення сигнал/шум і що зростання інтенсивності флюоресценції незв'язаного зонда на порядок за рахунок в'язкості зменшує чутливість методу на той же порядок. З практичного боку це означає, що потрібно уникати в'язких робочих розчинів з високими концентраціями інших природних біополімерів (білки, полісахариди тощо) для визначення нуклеїнових кислот.

Цікаві результати було одержано на основі вивчення спектральних властивостей серії барвників 10K, 11K, 12K. Всі вони структурно тотожні до симетричного бензтіазолового монометину Суап 45 (рисунок), який утворює з нуклеїновими кислотами комплекси з хорошими флюоресцентними властивостями [10]. Згідно з попередніми міркуваннями модифіковані барвники повинні існувати переважно в *транс*-формі, що зумовлено просторовими перешкодами в структурі молекули (однозначно підтвердити це може лише рентгеноструктурний аналіз або хоча б квантово-механічний розрахунок). Як наслідок, барвники у вільному



Хімічна структура Суап 45

стані і, можливо, в комплексі з нуклеїновою кислотою повинні були б мати підвищений рівень інтенсивності флюоресценції. Проте структурні аналоги Суап 45 практично не агрегували у водних розчинах, їхні комплекси з нуклеїновими кислотами мали низькі інтенсивності флюоресценції (табл. 2). Можливим поясненням цих результатів є те, що використаний для фіксації *транс*-ізомера циклогексановий структурний елемент ніколи не існує в плоскій формі. Набуваючи форму «крісла» або «ванни», він може виводити молекулу барвника з плоского стану (відсутність флюоресценції та низька агрегація) і як об'ємний замісник заважати агрегації та інтеркаляції.

Нарешті, потрібно зазначити унікальні спектральні властивості 14K. Цей карбоціанін у присутності БСА різко збільшує власну інтенсивність флюоресценції ( $I = 32,4$ ;  $I/I_0 = 648$ ) на противагу його комплексам з нуклеїновими кислотами з низьким рівнем флюоресценції. З'ясування можливого механізму цього цікавого феномену потребує спеціальних досліджень.

Автор щиро вдячний панам Ігореві Дубею та Валерію Ящуку за їхні слушні зауваження під час підготовки цього рукопису. Особливої подяки заслуговують пан Олександр Гоменюк за технічну допомогу в спектральних дослідженнях та пан Андрій Боголюбський — за любязно надані барвники.

С. Н. Ярмолюк

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 8. Изучение цианиновых красителей как флюоресцентных зондов для детекции нуклеиновых кислот

Резюме

Исучены 19 полиметиновых цианиновых красителей с разными гетероциклами как возможных флюоресцентных зондов для гомогенной детекции нуклеиновых кислот в растворе. Исследованы спектрально-люминесцентные свойства свободных красителей, в присутствии белка, а также их комплексов с



ДНК и РНК. Предложена модель «вязкого окружения» для объяснения возрастания интенсивности флюоресценции цианиновых красителей в их комплексах с нуклеиновыми кислотами.

S. M. Yarmoluk

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 8. Investigation of cyanine dyes as fluorescent probes for the nucleic acids detection

#### Summary

The nineteen polymethyne cyanine dyes with various heterocycles were investigated as possible fluorescent probes for the homogeneous nucleic acid detection in solution. Absorption and fluorescent properties of these dyes, their complexes with DNA and RNA and in the presence of protein were studied. A possible model of «viscous environment» for intensity enhancement of cyanine dyes in their fluorescent complexes with nucleic acids was proposed.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rye H. S., Yue S., Wemmer D. E., Quesada M. A., Haugland R. P., Mathies R. A., Glazer A. N. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20.—P. 2803—2812.
2. Rye H. S., Dabora J. M., Quesada M. A., Mathies R. A., Glazer A. N. Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity // *Anal. Biochem.*—1993.—208.—P. 144—150.
3. Hiron G. T., Fawcett J. J., Crissman H. A. // *Cytometry.*—1994.—15.—P. 129—140.
4. Rye H. S., Drees B. L., Nelson H. C. M., Glazer A. Stable fluorescent dye-DNA complexes in high sensitivity detection of protein-DNA interactions // *J. Biol. Chem.*—1993.—268.—P. 25229—25238.
5. Godwin P. M., Johnson M. E., Martin J. C., Ambrose W. P., Marrone B. L., Jett J. H., Keller R. A. Rapid sizing of individual fluorescently stained DNA fragments by flow cytometry // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21.—P. 803—806.
6. Skeidssvoll J., Ueland P. M. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR Green I // *Anal. Biochem.*—1995.—231.—P. 359—365.
7. Lee G. L., Chen C.-H., Chiu L. A. Thiazole Orange: a new dye for reticulocyte analysis // *Cytometry.*—1986.—7.—P. 508—517.
8. Haugland R. P. Molecular probes. Handbook of fluorescent probes and research chemicals // *Molecular Probes.*—Eugene: OR, 1996.—679 p.
9. Carrlsson C., Larsson A., Jonsson M. et al. Optical and photophysical properties of the oxazole yellow DNA probes YO and YOYO // *J. Phys. Chem.*—1994.—98.—P. 10313—10321.
10. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Smirnova T. V. et al. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 2. Spectroscopic properties of methyleoxy analogues of thiazole orange // *Biopolymery i kletka.*—1996.—12, N 6.—P. 74—81.
11. Rye H. S., Glazer A. N. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23.—P. 1215—1222.
12. Yarmoluk S. M., Zhyvoloup A. N., Kovalska V. B., Klimenko I. V., Kukhareno A. P., Kovtun Yu. P., Slominsky Yu. L. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. I. Studies on monomethine cyanine dyes as possible fluorescent probes for the detection of nucleic acids // *Biopolymery i kletka.*—1996.—12, № 1.—P. 69—74.
13. Ищенко А. А. Структура и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей—К.: Наук. думка, 1994.—231 с.
14. Jacobsen J. P., Pedersen J. B., Hansen L. F., Wemmer D. E. Site selective bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA oligonucleotides // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23.—P. 753—760.

УДК 542.95

Надійшла до редакції 12.03.98