

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 12. Нові монометинові ціаніни на основі 5,6-метилендіоксibenзотіазолу та спектрально-люмінесцентні властивості їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами

С. С. Лукашов, М. Ю. Лосицький, С. М. Ярмолюк, Ю. Л. Сломінський¹

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

¹ Інститут органічної хімії НАН України
Вул. Мурманська, 5, Київ, 02094, Україна

На основі ядра 5,6-метилендіоксibenзотіазолу синтезовано сім нових монометинових ціанінових барвників з гетероциклічними залишками різної геометрії та електронодonorності. Досліджено їхні оптичні властивості в присутності ДНК, РНК та білка. Деякі з синтезованих барвників є перспективними об'єктами для подальших досліджень та застосування в аналізі нуклеїнових кислот. Порівняння флуоресцентних властивостей синтезованих барвників та їхніх аналогів з незаміщеним гетерозалишком бензотіазолу в присутності нуклеїнових кислот дозволило зробити деякі уточнення до моделі напівінтеркаляції монометинових ціанінів у ДНК.

Вступ. Протягом останнього десятиріччя флуоресцентні зонди широко використовуються для детекції нуклеїнових кислот (НК) у різних галузях біології та медицини [1]. Простота апаратури, можливість одночасної багатоканальної детекції, безпека, тривалий термін зберігання — ці та інші переваги флуоресцентних методів аналізу НК над традиційними радіоізотопними ведуть до поступового витіснення останніх.

Несиметричні монометинові ціанінові барвники вперше було застосовано для детекції НК у 1986 р. [2]. За час, що минув, на основі таких барвників створено сучасні високочутливі зонди та мітки різних типів (мономерні, гомодимерні барвники та гетеродимерні з переносом енергії, кон'югати з олігонуклеотидами, білками тощо), а також численні методики аналізу біомолекул, що за чутливістю не поступаються радіоізотопним [3—9].

Монометинові ціаніни мають високі молярні

коефіцієнти екстинкції ($\epsilon \geq 50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), середню фотостійкість і серед інших барвників вирізняються найбільшим підвищенням квантового виходу флуоресценції (у 10^2 — 10^3 рази) при взаємодії з НК. Такі властивості ціанінів дозволяють досягати в детекції НК високих значень співвідношення сигнал/шум і використовувати їх у гомогенних системах НК-аналізу [6, 11].

Останні 10 років відзначаються активним пошуком серед ціанових барвників нових люмінофорів для флуоресцентної детекції НК [10]. Раніше нами з цією метою було запропоновано ряд нових перспективних барвників на основі гетероциклічного ядра 5,6-метилендіоксibenзотіазолу [12]. В продовження цієї роботи синтезовано серію нових монометинових ціанінів, у яких це ядро конденсоване з різноманітними гетероциклічними залишками, і досліджено оптичні властивості отриманих барвників у присутності ДНК та РНК.

Матеріали і методи. *Матеріали.* 5,6-метилендіоксibenзотіазол ($T_{\text{топл}} 118 \text{ }^\circ\text{C}$) люб'язно наданий

А. Боголюбським. Його метилметосульфат ($T_{\text{топл}} 263^\circ\text{C}$) отримували нагріванням з 1 екв. диметилсульфату в діоксані. Метилметосульфати 2-метилмеркаптобензотіазолу ($T_{\text{топл}} 161^\circ\text{C}$), 2-метилмеркаптобензооксазолу ($T_{\text{топл}} 98^\circ\text{C}$) та 4-метилмеркаптохіноліну ($T_{\text{топл}} 218^\circ\text{C}$) синтезували алкілюванням відповідно 2-меркаптобензотіазолу, 2-меркаптобензооксазолу [13] та 4-хінолінтіону [14] спочатку 1 екв. йодистого метилу над поташом в ацетоні і потім 1 екв. диметилсульфату при 30-хв кип'ятінні в діоксані. N-метил-2-піридин- та N-метил-2-хінолінсульфобетайні ($T_{\text{топл}} 260$ та 276°C (розкл.)) отримали з відповідних N-метилетарил-2-онів [15] хлоруванням оксалілхлоридом у бензолі і заміщенням галогену на сульфогрупу в надлишку водного NaHSO_3 . 2,6-диметил-4-пірон — декарбоксилуванням дегідрасетової кислоти («Aldrich», США) у 20 %-му розчині соляної кислоти [16]. N-метил-4-піридинсульфобетайн ($T_{\text{топл}} 334^\circ\text{C}$ (розкл.)) з 4-піридинсульфокислоти [17] одержали алкілюванням 1 екв. диметилсульфату в ДМФА. Метилметосульфат 6-метилмеркаптоакридину використовували без виділення після алкілювання N-метил-акридин-6-тіону ($T_{\text{топл}} 243^\circ$) [18] 1 екв. диметилсульфату в ДМФА.

Для всіх спектральних досліджень використовували ДНК з тимусу бика, сумарну дріжджову РНК та альбумін з сироватки бика, отримані від «Sigma» (США).

Тонкошарову хроматографію виконували на пластинках SILUFOL UV-254 (Чехія) у системах А — хлороформ:метанол (9:1) та Б — бутанол:оцтова кислота:вода (4:1:1).

Для всіх спектральних досліджень у водних розчинах використовували 0,05 М трис-НСІ-буфер, рН 7,5.

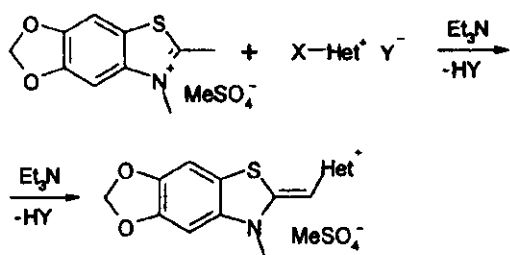


Схема 1. Для S-02, S-03 і S-05 $X = \text{SO}_3^-$, для S-01, S-06 і S-07 $X = \text{SMe}$, Het = S-01 — 2-[N-метил-бензотіазолій], S-02 — 2-[N-метил-піридиній], S-03 — 4-[N-метил-піридиній], S-05 — 2-[N-метил-хіноліній], S-06 — 4-[N-метил-хіноліній], S-07 — 9-[N-метил-акридиній]

Синтез барвників. Барвники S-01—S-03 та S-05—S-07 було синтезовано за стандартними методиками (схема 1) [19] з середніми та високими виходами. Хімічну будову та чистоту сполук підтверджено спектрами ЯМР H^1 . (Застосовані скорочення: с — синглет; м — нерозділений мультиплет; д — дуплет; дд — дуплет дуплетів; шс — уширений синглет.)

7-метил-6-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензоксазол-2-іліденметил) [1,3]діоксоло[4',5':4,5]бензо[d][1,3]тіазолій метилметосульфат (S-01). Вихід 48 %. $T_{\text{топл}} 363^\circ\text{C}$ (розкл.) (EtOH). ПМР: с 3,40 (3H), с 3,90 (3H), с 3,92 (3H), с 6,15 (2H), с 6,51 (1H), с 7,12 (2H), м 7,35—7,80 (5H), м 8,10 (1H).

1-метил-2-(7-метил-6,7-дигідро[1,3]діоксоло[4',5':4,5]бензо[d][1,3]тіазол-6-іліденметил) піридиній метилметосульфат (S-02). Вихід 78 %. $T_{\text{топл}} 333^\circ\text{C}$ (AcOH). ПМР: с 3,37 (3H), с 3,39 (3H), с 3,94 (3H), с 5,69 (1H), с 6,13 (2H), дд 7,1 (1H, 7 Гц, 7 Гц), с 7,38 (1H), с 7,49 (1H), д 7,71 (1H, 9 Гц), дд 8,07 (1H, 7 Гц, 9 Гц), д 8,4 (1H, 7 Гц).

1-метил-4-(7-метил-6,7-дигідро[1,3]діоксоло[4',5':4,5]бензо[d][1,3]тіазол-6-іліденметил) піридиній метилметосульфат (S-03). Вихід 87 %. $R_f = 0,05$ (Б). $T_{\text{топл}} 330^\circ\text{C}$ (AcOH). ПМР: с 3,39 (3H), с 3,67 (3H), с 3,93 (3H), с 6,11 (1H), с 6,12 (2H), д 7,24 (2H, 7 Гц), с 7,33 (1H), с 7,48 (1H), д 8,14 (2H, 7 Гц).

1-метил-2-(7-метил-6,7-дигідро[1,3]діоксоло[4',5':4,5]бензо[d][1,3]тіазол-6-іліденметил) хіноліній метилметосульфат (S-05). Вихід 78 %. $T_{\text{топл}} 346^\circ\text{C}$ (EtOH). ПМР: с 3,38 (3H), с 3,90 (3H), с 4,02 (3H), с 6,03 (1H), с 6,18 (2H), м 7,5—7,6 (3H), м 7,8—7,9 (3H), дд 8,0 (1H, 1,5 Гц, 10 Гц), дд 8,27 (1H, 1 Гц, 10 Гц).

1-метил-4-(7-метил-6,7-дигідро[1,3]діоксоло[4',5':4,5]бензо[d][1,3]тіазол-6-іліденметил) хіноліній метилметосульфат (S-06). Вихід 72 %. $T_{\text{топл}} 345^\circ\text{C}$ (EtOH). ПМР: с 3,41 (3H), с 3,87 (3H), с 4,0 (3H), с 6,14 (2H), с 6,63 (1H), м 6,92 (1H), с 7,32 (1H), с 7,43 (1H), дд 7,65 (1H, 6 Гц, 8 Гц), м 7,86 (2H), д 8,31 (1H, 8 Гц), д 8,53 (1H, 8 Гц).

10-метил-9-(7-метил-6,7-дигідро[1,3]діоксоло[4',5':4,5]бензо[d][1,3]тіазол-6-іліденметил) акридиній перхлорат (S-07). Вихід 64 %. $R_f = 0,7$ (Б). $T_{\text{топл}} 170^\circ\text{C}$ (моносолеват ДМФА) (ДМФА/MeOH). ПМР: с 2,74 (3H), с 2,89 (3H), с 3,89 (3H), с 4,19 (3H), с 6,24 (2H), с 7,07 (1H), м 7,31 (2H), с 7,60 (1H), шс 7,75 (4H), с 7,95 (1H), д 8,27 (2H, 8 Гц).

7-метил-6-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліденметил) [1,3]діоксоло[4',5':4,5]бензо[d][1,3]тіазолій метилметосульфат (Суап 13). Вихід 39 %. $R_f = 0,35$ (Б). $T_{\text{топл}} 355^\circ\text{C}$ (розкл.) (EtOH). ПМР: с 3,38 (3H), с 3,78 (3H), с 3,92 (3H), с 6,14

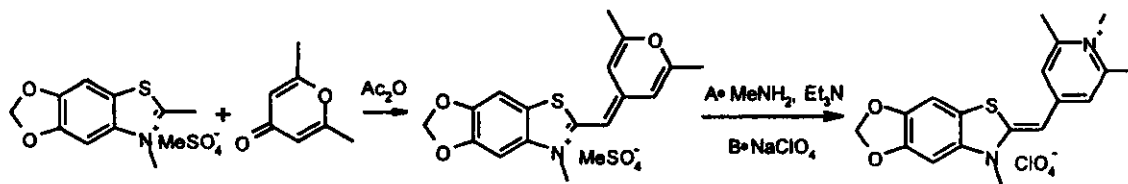


Схема 2. Синтез барвника S-04

(1H), с 6,18 (2H), дд 7,4 (1H, 6 Гц, 8 Гц), м 7,45—7,55 (2H), м 7,63 (2H), д 7,25 (1H, 8 Гц).

1,2,6-триметил-4-(7-метил-6,7-дигідро[1,3]діоксо[4',5':4,5]бензо[*d*][1,3]тіазол-6-іліденметил)піридиній перхлорат (S-04) отримали через відповідну пірилієву сіль [20] (схема 2). Вихід 56 %. $T_{\text{топл}}$ 360 °С (розкл.) (AcOH). ПМР: с 2,60 (6H), с 3,78 (3H), с 3,75 (3H), с 5,94 (1H), с 6,31 (2H), с 7,12 (2H), с 7,37 (1H), с 7,49 (1H).

Барвники BO, Суан 40, Суан 45 та Суан 47 були синтезовані аналогічно до відповідних метилендіоксibenзотіазолових барвників, згідно з [19].

Приготування стокових розчинів нуклеїнових кислот та барвників. Для приготування стокових розчинів барвників концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ М їх розчиняли в ДМСО і зберігали при -10 °С. Стокові розчини НК готували в буфері з концентрацією $6 \cdot 10^{-3}$ моль пар основ/л для ДНК і $1,2 \cdot 10^{-2}$ моль основ/л для РНК.

Приготування робочих розчинів. В усіх робочих розчинах концентрація барвника становила 10^{-5} моль/л. Розчини готували безпосередньо перед вимірюваннями.

Робочі розчини вільних барвників одержували розведенням їхніх стокових розчинів буфером або ацетонітрилом.

Для приготування робочих розчинів комплексів барвників з НК стокові розчини відповідних НК розводили в буфері до концентрацій $6 \cdot 10^{-3}$ моль пар основ/л для ДНК та $1,2 \cdot 10^{-4}$ моль основ/л для РНК і до отриманих розчинів додавали стокові розчини барвників. Співвідношення барвник:НК у комплексах становило 1 молекула барвника на 12 основ РНК або на 6 пар основ ДНК.

Для дослідження оптичних властивостей барвників у присутності білка стокові розчини барвників змішували зі щойно приготованим розчином білка концентрації 1 мг/мл.

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання робочих розчинів записували за допомогою спектрофотометра Spereord M-40 (Німеччина).

Для реєстрації спектрів флюоресценції використували флюоресцентний спектрофотометр Hitachi Model 850 (Японія).

Для збудження флюоресценції застосовували випромінювання ксенонової лампи (150 Вт). Флюоресцентне випромінювання збуджували на довжинах хвиль максимумів поглинання мономерів барвника (табл. 1).

Всі оптичні виміри проводили в кварцових кюветах розміром 1×1 см.

Спектри 1 ЯМР отримували на приладі «Vagian» (300 МГц) в ДМСО- d_6 з внутрішнім стандартом ТМС.

Титрування. Для здійснення титрування ДНК барвником S-06 при дослідженні поглинання та барвником S-01 при вимірюванні інтенсивності флюоресценції безпосередньо перед вимірюваннями готували допоміжні розчини барвників у ДМСО з концентраціями $2 \cdot 10^{-4}$ та $2 \cdot 10^{-5}$ М. Під час титрування до робочого розчину ДНК з концентрацією $6 \cdot 10^{-5}$ моль пар основ/л послідовно додавали стоковий чи допоміжні розчини барвника. Для одержання робочих розчинів з концентраціями барвників $\leq 3,2 \cdot 10^{-7}$ М використовували $2 \cdot 10^{-5}$ М допоміжні розчини барвників, для розчинів з концентраціями від $6,4 \cdot 10^{-7}$ до $4 \cdot 10^{-6}$ М — допоміжні розчини з концентрацією $2 \cdot 10^{-4}$ М, решту розчинів готували додаванням стокових розчинів барвників.

Для титрування барвника S-01 ДНК до 10^{-5} М робочого розчину барвника в буфері поступово додавали стоковий розчин ДНК.

Результати. Характеристики спектрів поглинання барвників у вільному стані та в присутності НК і білка подано в табл. 1.

Вільні барвники. Розчини барвників в ацетонітрилі характеризуються високими значеннями коефіцієнта молярної екстинкції ($\epsilon^{\text{вільн}} = (1,77—8,54) \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Спектри поглинання цих розчинів містять у видимій області лише один чітко виділений максимум (рис. 1, а—в, криві 1), довжина хвилі якого ($\lambda_{\text{погл}}^{\text{вільн}}$) для різних барвників знаходиться в інтервалі від 416 до 564 нм (табл. 1, рис. 2). Оскільки в межах дослідних концентрацій агрегація барвників в ацетонітрилі відсутня [21], цей

Таблиця 1
Характеристики спектрів поглинання барвників

Барвник	Вільні барвники			
	Ацетонітрил		Буфер	
	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{ацн}}$, нм	$\varepsilon_{\text{ацн}} \cdot 10^{-4}$, $\text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{б}}$, нм	$\varepsilon_{\text{б}} \cdot 10^{-4}$, $\text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$
S-01	—	—	395	6,05
	416,3	7,83	413	6,40
S-02	455,3	4,07	452	4,05
S-03	465,9	5,37	461	5,16
S-04	475,4	4,86	453	3,73
S-05	495	3,71	483	1,77
	—	—	—	—
S-06	—	—	470	3,02
	—	—	488 (пл)*	2,98
	525,1	5,47	529 (пл)*	1,68
S-07	564,0	1,77	556	1,43
Суан 13	400 (пл)*	6,52	415	3,81
	438,9	8,54	437	3,31
ТО	—	—	476	3,33
	501,4	6,71	501	3,56

Барвник	Барвники в присутності РНК		Барвники в присутності ДНК		Барвники в присутності БСА	
	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{РНК}}$, нм	$\varepsilon_{\text{РНК}} \cdot 10^{-4}$, $\text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДНК}}$, нм	$\varepsilon_{\text{ДНК}} \cdot 10^{-4}$, $\text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{БСА}}$, нм	$\varepsilon_{\text{БСА}} \cdot 10^{-4}$, $\text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$
S-01	402	4,86	—	—	395	6,25
	417 (пл)*	4,56	413	5,86	413	6,65
S-02	452,5	3,22	454	3,82	452	3,94
S-03	462	4,01	465	4,52	461	5,26
S-04	451	2,98	455	3,65	453	4,14
S-05	481	0,14	485	1,69	485	1,70
	521 (пл)*	0,90	—	—	—	—
S-06	474	2,48	457	1,84	470	3,20
	490	2,42	495	2,02	488	3,06
	532 (пл)*	1,51	529	1,82	526 (пл)*	1,80
S-07	568	1,41	567	1,37	560	1,42
Суан 13	419	3,02	425 (пл)*	2,78	415	3,84
	440 (пл)*	2,36	440	2,89	437	3,37
ТО	478	2,73	483 (пл)*	3,47	476	3,40
	505	2,48	504	4,37	501	3,67

*пл — проявляється у формі плеча.

максимум відповідає поглинанню неагрегованих молекул барвника. Значення $\lambda_{\text{погл}}^{\text{ацн}}$ використовували для збудження флуоресценції барвників.

Збільшення нуклеофільності середовища при переході від ацетонітрилу до буфера спричиняє для всіх барвників гіпсохромний зсув (до 12 нм) макси-

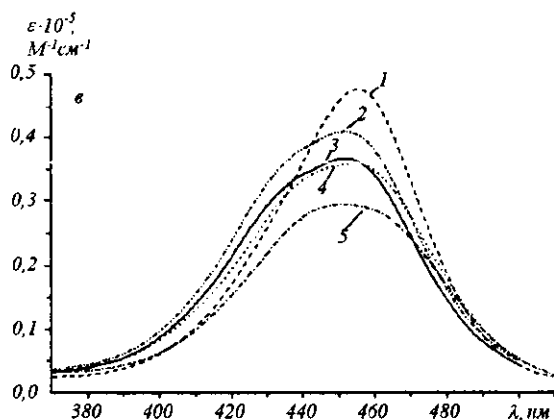
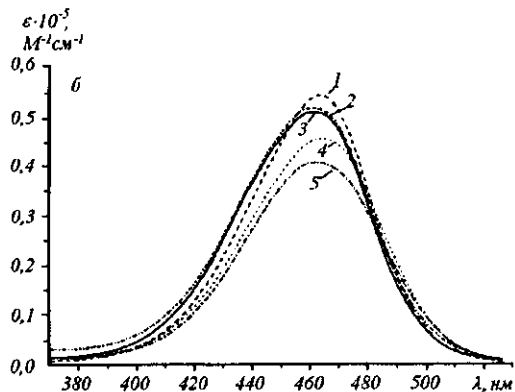
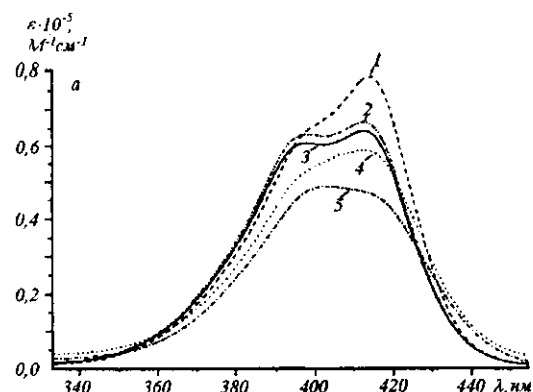


Рис. 1. Спектри поглинання барвників S-01 (а), S-03 (б) та S-04 (в): 1 — вільний барвник в ацетонітрилі; 2 — барвник у присутності БСА; 3 — вільний барвник у буфері; 4 — барвник у присутності ДНК; 5 — барвник у присутності РНК

муму молекулярної смуги поглинання ($\lambda_{\text{погл}}^{\text{вб}}$) та зменшення коефіцієнта молярної екстинкції ($\epsilon^{\text{вб}}$) порівняно з $\epsilon^{\text{анн}}$ в 1—2 рази (рис. 1, а—в, криві 3). У спектрах поглинання барвників S-01, S-06, Суан 13 та ТО спостерігаються смуги агрегатів, зсунуті на 20—40 нм у короткохвильовий бік відносно молекулярного максимуму (рис. 2). Агрегатна смуга барвника S-06 набагато інтенсивніша за мономерну і містить два максимуми при 470 та 488 нм. Смуга поглинання мономерних молекул цього барвника (516 нм) проявляється лише у вигляді плеча на довгохвильовому краї агрегатної смуги. Барвники S-01, ТО та Суан 13 мають лише одну агрегатну смугу. Спектри поглинання водних розчинів решти барвників не містять чітко виділених агрегатних смуг (рис. 2).

Поглинання комплексів барвників з нуклеїновими кислотами. Порівняно зі спектрами вільних барвників у буфері в присутності нуклеїнових кислот майже для всіх барвників спостерігається незначний (не більше 12 нм) зсув молекулярного максимуму ($\lambda_{\text{погл}}^{\text{РНК}}$ у випадку РНК та $\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДНК}}$ для ДНК) у довгохвильову область (крім S-01 у присутності ДНК та S-04 і S-05 у присутності РНК)

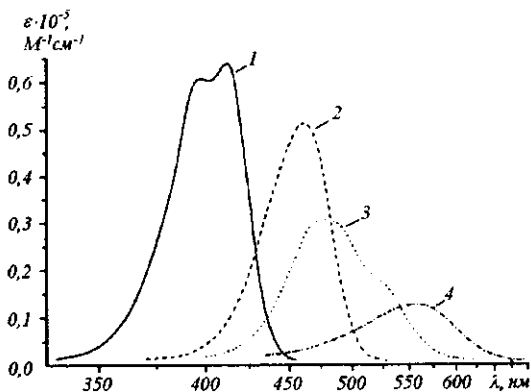


Рис. 2. Спектри поглинання вільних барвників S-01 (1), S-03 (2), S-06 (3) та S-07 (4) в буфері

(рис. 1, а—в, криві 4, 5), а також падіння значення $\epsilon^{\text{РНК}}$ та $\epsilon^{\text{ДНК}}$ на 10—30 % порівняно з $\epsilon^{\text{вб}}$ (крім ТО в присутності ДНК). У спектрах S-01, Суан 13 та ТО спостерігається також перерозподіл інтенсив-

ності між молекулярними та агрегаційними максимумами, так що для всіх трьох барвників відносний внесок агрегатного поглинання зменшується в присутності ДНК, але зростає в суміші з РНК.

У спектрі S-06 у присутності ДНК спостерігається значне падіння інтенсивності агрегатної смуги та чіткіше розділення двох її складових (інтервал між максимумами цих складових змінюється з 18 нм для вільного барвника до 41 нм для барвника в присутності ДНК). Максимум поглинання мономера, який для вільного барвника мав форму плеча, в присутності ДНК зростає та набуває чітко розділеної форми. Було проведено титрування $3 \cdot 10^{-5}$ моль пар основ/л ДНК барвником S-06 (рис. 3). З'ясувалося, що при концентрації S-06, рівній $6,4 \cdot 10^{-7}$ М, спектр (крива 1) складається з мономерної смуги ($\lambda = 529$ нм) та плеча на місці першої (більш довгохвильової) агрегатної смуги ($\lambda = 498$ нм). Вже при $5,4 \cdot 10^{-6}$ М (крива 2) ця смуга зрівнюється з мономерною, а при 10^{-5} М (крива 3), тобто при співвідношенні ≈ 1 молекула барвника на 3 пари основ ДНК, з'являється чітко виділена друга (більш короткохвильова) агрегатна смуга ($\lambda = 457$ нм). При подальшому збільшенні концентрації барвника до $3 \cdot 10^{-5}$ М (крива 4) інтенсивність саме цієї смуги стрімко зростає.

Спектри поглинання барвників у присутності білка. Спектри поглинання досліджуваних барв-

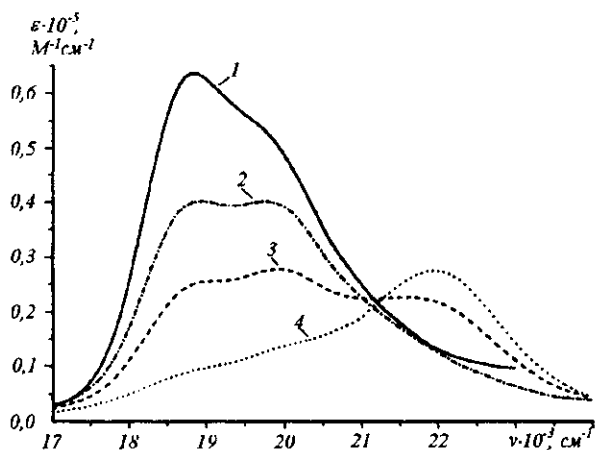


Рис. 3. Спектри поглинання S-06 у присутності $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л ДНК. Концентрації барвника (моль/л): 1 — $6,4 \cdot 10^{-7}$ (1 молекула барвника:47 пар основ (п. о.) ДНК); 2 — $5,4 \cdot 10^{-6}$ (1 молекула барвника:6 п. о. ДНК); 3 — 10^{-5} (1 молекула барвника:3 п. о. ДНК); 4 — $3 \cdot 10^{-5}$ (1 молекула барвника:1 п. о. ДНК)

ників у присутності білка за формою та положенням ідентичні спектрам вільного барвника (за винятком зсуву максимумів поглинання S-05 та S-07 на 2—4 нм), відрізняються від них лише невеликими змінами ε^{BCA} (як у бік збільшення, так і зменшення) (рис. 1, а—в, криві 2).

Флюоресцентні характеристики барвників у вільному стані і в присутності нуклеїнових кислот і білка зібрано в табл. 2.

Власна флюоресценція барвників. Для всіх барвників характерні невисокі значення інтенсивності власної флюоресценції ($I_0 = 0,011—0,116$ відносної одиниці (в. о.)). Виняток становлять S-01 та Суап 13 (відповідно 2,795 і 0,575 в. о.). Значення довжин хвиль максимумів випромінювання (λ_{fl}^{66}) лежать у межах від 465 нм до 545 нм. Значення стоксового зсуву (ΔS^{66}) для розчинів усіх барвників, крім S-05 та S-07, знаходяться в інтервалі 44—111 нм. Барвники S-05 та S-07 не мають чіткого максимуму випромінювання.

Комплекси барвників з нуклеїновими кислотами. Для характеристики зростання інтенсивності флюоресценції барвника в присутності ДНК, РНК та білка (відповідно $I^{ДНК}$, $I^{РНК}$ та I^{BCA}) відносно I_0 використано відношення цих інтенсивностей (відповідно $I^{ДНК}/I_0$, $I^{РНК}/I_0$ та I^{BCA}/I_0). Значення $I^{ДНК}/I_0$ та $I^{РНК}/I_0$ у всіх барвників суттєво більші за одиницю (від 11 до 609), за винятком S-07, у якого значення $I^{РНК}/I_0$ становить 1,5, а $I^{ДНК}/I_0$ є рівним 1,0. Причому для барвників S-02, S-06 та ТО відношення $I^{ДНК}/I_0$ є більшим, ніж $I^{РНК}/I_0$ (в 1,5—2 рази), тоді як для S-03, S-04 та S-05 значення $I^{ДНК}/I_0$ є меншим, ніж $I^{РНК}/I_0$ (вдвічі для S-03, у 4 рази для S-04 і втричі для S-05). Інтенсивність флюоресценції комплексів барвників S-01 та Суап 13 з ДНК є приблизно такою ж, як і в їхніх комплексів з РНК.

Значення стоксових зсувів S-02 у присутності НК ($\Delta S^{ДНК}$ та $\Delta S^{РНК}$) приблизно в 1,5 рази більші, ніж ΔS^{66} . У той же час для барвників ТО, Суап 13 та S-06 $\Delta S^{ДНК}$ та $\Delta S^{РНК}$ зменшуються порівняно з ΔS^{66} (для S-06 більше ніж удвічі, для ТО та Суап 13 приблизно в 1,5 рази), для решти барвників вони майже не змінюються. Слід зазначити, що в спектрах флюоресценції сумішей S-05 з ДНК та з РНК, а також S-07 з РНК з'являється чіткий максимум випромінювання, якого в спектрах вільних барвників не було.

Флюоресцентне титрування. Досліджували залежність інтенсивності флюоресценції комплексів S-01 з ДНК від концентрації барвника при сталій концентрації ДНК (титрування ДНК барвником), а також від концентрації ДНК при сталій концентрації барвника (титрування барвника ДНК).

Таблиця 2
Характеристика спектрів флюоресценції барвників

Барвник	Вільні барвники			Барвники в присутності РНК			
	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{вб}}$, нм	$\Delta S^{\text{вб}}$, нм	I_0 , в. о.*	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{РНК}}$, нм	$\Delta S^{\text{РНК}}$, нм	$I^{\text{РНК}}$, в. о.	$I^{\text{РНК}}/I_0$
S-01	465	52	2,795	465	48	87,9	31,4
S-02	510	58	0,016	545	92	0,85	53,1
S-03	515	54	0,045	520	58	8,02	178
S-04	514	61	0,116	512	61	39,3	338
S-05	—	—	0,013	604	123	0,41	31,2
S-06	640	111	0,021	585	53	1,65	78,6
S-07	—	—	0,011	625	57	0,016	1,50
Суан 13	520	83	0,575	495	55	47,2	82,1
ТО	545	44	0,028	540	35	10,35	370

Барвник	Барвники в присутності ДНК				Барвники в присутності БСА			
	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДНК}}$, нм	$\Delta S^{\text{ДНК}}$, нм	$I^{\text{ДНК}}$, в. о.	$I^{\text{ДНК}}/I_0$	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{БСА}}$, нм	$\Delta S^{\text{БСА}}$, нм	$I^{\text{БСА}}$, в. о.	$I^{\text{БСА}}/I_0$
S-01	460	47	95,1	34	460	47	5,130	2,1
S-02	542	88	1,10	68,7	510	58	0,048	2,2
S-03	520	55	4,30	96	512	51	0,206	4,6
S-04	512	57	9,02	78	512	59	1,194	4,2
S-05	615	130	0,15	11	600	115	0,033	2,5
S-06	575	46	3,16	150	605	76	0,075	3,6
S-07	—	—	0,01	1,0	625	65	0,017	1,6
Суан 13	495	55	40,1	69,7	505	68	1,420	2,5
ТО	533	29	17,05	609	543	44	0,240	6,3

*в. о. — відносні одиниці флюоресценції.

З результатів титрування барвника S-01 ДНК (рис. 4, а) бачимо, що при співвідношеннях кількості пар основ ДНК до числа молекул барвника S-01 (п. о.:барвник) від 0,6 до 4,8 інтенсивність зростає лінійно, при більших співвідношеннях зростання стає повільнішим і при співвідношенні барвник/п. о. = 32 воно припиняється.

Результати титрування ДНК барвником S-01 (рис. 5, б) вказують на те, що максимальна інтенсивність флюоресценції комплексів S-01 з ДНК досягається при співвідношенні кількості молекул барвника до числа пар основ ДНК (барвник/п. о.) близько 0,14, після чого інтенсивність зменшується. Звернемо увагу на те, що область зростання інтенсивності можна поділити на дві ділянки, на кожній з яких інтенсивність зростає лінійно. При-

чому перша ділянка залежності (при значеннях барвник/п. о. від $3,3 \cdot 10^{-4}$ до $2,5 \cdot 10^{-2}$) є більш крутою, ніж друга (від $2,5 \cdot 10^{-2}$ до 0,13).

Спектри випромінювання сумішей барвників з білком. Для розчинів барвників у присутності білка величина $I^{\text{БСА}}/I_0$ лежить у межах від 1,6 до 6,3, тобто зростання інтенсивності флюоресценції не є значним. У спектрах S-01, S-03, S-04 та ТО спостерігається зсув максимуму смуги випромінювання ($\lambda_{\text{фл}}^{\text{БСА}}$) на 2—5 нм у короткохвильовий бік відносно максимуму флюоресценції розчину вільних барвників. Для S-02 положення смуги в присутності білка не змінюється, а для S-06 та ТО короткохвильовий зсув є досить значним (відповідно 35 та 15 нм).

Обговорення результатів. З моменту відкриття

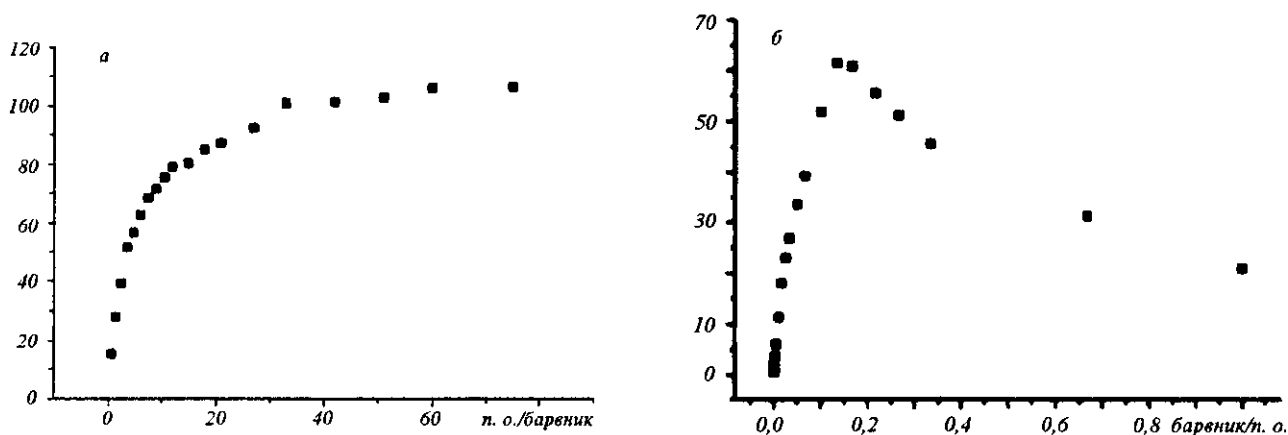


Рис. 4. Титрування барвника S-01 ДНК (а) та ДНК — барвником S-01 (б). По осі ординат — інтенсивність флюоресценції

у 1986 р. зростання на три порядки інтенсивності люмінесценції тіазолового оранжевого (ТО) в присутності ДНК [2] монометинові ціанінові барвники широко застосовуються для флюоресцентної детекції НК. Незважаючи на різноманіття монометинових ціанінів, в аналізі НК використовується лише невелика їхня група, структурно подібних до ТО або до оксазолового жовтого YO [1, 11].

Раніше нами як потенційні люмінофори для флюоресцентної детекції НК досліджено ряд нових монометинових ціанінів [12]. Серед них найкращими оптичними властивостями відзначаються барвники, що містять гетерозалишок 5,6-метилendioксисбензотіазолу. Для отримання перспективних люмінофорів для детекції НК ми синтезували серію нових монометинових ціанінів, у яких ядро 5,6-метилendioксисбензотіазолу конденсоване з рядом різних гетерозалишків.

Синтезовані барвники мають флюоресцентні властивості, які дозволяють сподіватися на застосування їх у детекції НК. Так, за інтенсивністю випромінювання S-01 переважає ТО в присутності дДНК в 6, а в присутності РНК — у 10 разів (табл. 2). Для S-04 значення $I^{РНК}$ значно перевищує величини $I^{дНК}$, що може бути використано в детекції РНК.

Для монометинових ціанінів структуру комплексів з нуклеїновими кислотами вивчено недостатньо. Розуміння механізму зв'язування дало б можливість цілеспрямованого пошуку барвників,

що мали б високу інтенсивність флюоресценції в присутності НК і виявляли специфіку до типу НК та послідовності основ.

Ларссон та ін. [22] на прикладі барвника YO-PRO-1 показали, що при взаємодії монометинових ціанінів з ДНК реалізуються два типи зв'язування. При співвідношенні барвник:пари основ ДНК, менших ніж 1:8, він зв'язується за рахунок інтеркаляції, а при збільшенні цього співвідношення починає додаватися зовнішнє зв'язування під дією гідрофобних і диполь-дипольних взаємодій та водневих зв'язків до малої чи великої борозенки. Другий тип зв'язування дає комплекси, в яких барвник фіксується недостатньо жорстко і не показує суттєвого збільшення квантового виходу флюоресценції.

Детальне вивчення просторової будови комплексів монометинових ціанінів з дволанцюговими олігодезоксирибонуклеотидами у водному розчині за допомогою спектроскопії ЯМР H^1 було проведене Якобсеном та ін. для гомодимерного барвника ТОТО [23]. Визначена структура комплексу відповідає моделі повної інтеркаляції Лермана [24]. Встановлено, що люмінофори ТОТО майже повністю розташовуються в порожнинах між парами основ НК, і залишок бензотіазолу знаходиться між піримідинами, а хіноліну — між пуринами.

Як показали Рай та ін. [25], ТОТО здатний зв'язуватися з НК не тільки шляхом повної інтеркаляції. Рівень флюоресценції його комплексу з

Таблиця 3
Інтенсивність флюоресценції длДНК-комплексів метилendioксибензотіазольних барвників та їхніх незаміщених аналогів

Барвник	Барвник з незаміщеним залишком бензотіазолу	I_{\max} ф., в. о.	$I_{\text{ДНК}}/I_0$	Барвник	Барвник з залишком 5,6-метилendioксибензотіазолу	I_{\max} ф., в. о.	$I_{\text{ДНК}}/I_0$
Суан 47		39,8	54	S-01		101,1	34
Суан 45		31,4	88	Суан 13		40,1	69,7
BO		12,2	260	S-03		4,3	96
Суан 40		20,43	262	S-04		9,02	78
ТО		17,05	609	S-06		3,16	150

одноланцюговою ДНК занадто високий, щоб бути обумовленим лише взаємодією барвника з можливими дволанцюговими ділянками. Автори використали для пояснення цього явища модель «часткової» інтеркаляції Прітчарда [26]. Хромофори ТО з гнучким метиновим ланцюгом у центральній частині можуть бути зафіксовані основами одного ланцюга ДНК під дією кулонівської взаємодії їхніх позитивних зарядів з фосфатними іонами та стекингу.

Раніше нами було запропоновано гіпотезу напівінтеркаляції монометинових ціанінів у дволанцюгову ДНК [27]. Згідно з нею, менш електродонорний гетероциклічний залишок вбудовується між парами основ, а більш електродонорний — зміщується в бік борозенки завдяки електростатичній взаємодії диполу барвника з фосфатним іоном.

Інтенсивність випромінювання всіх синтезованих нами барвників (окрім S-07) у присутності і ДНК, і РНК на один—два порядки перевищує інтенсивність їхнього випромінювання в присутності білка. Зв'язування з білком здійснюється за рахунок гідрофобного налипання та електростатичної взаємодії і, очевидно, є подібним до борозенкового зв'язування з НК. Форми смуг поглинання у спектрах S-01, Суан 13, S-06 та ТО в присутності ДНК та РНК істотно змінюються, тоді як у присутності білка вони практично ідентичні формам смуг у спектрах вільних барвників. Це свідчить на користь саме інтеркаляційного характеру взаємодії розглянутих барвників (за винятком S-07) з ДНК та РНК у межах досліджуваних концентрацій.

При порівнянні оптичних властивостей комплексів серії синтезованих барвників з дволанцюговою ДНК з властивостями комплексів, утворених

аналогами цих барвників з незаміщеним залишком бензотіазолу, спостерігаються деякі закономірності. Обмежимося розглядом лише стеричних перешкод для інтеркаляції у НК, що виникають при введенні метилендіокси-групи до бензотіазолового залишку молекул барвників (табл. 3).

Додаткові просторові ускладнення для інтеркаляції, спричинені метилендіокси-групою, введеною до бензотіазолового залишку ТО, призводять до більш ніж триразового зменшення відношення $I^{ДНК}/I_0$ для отриманого S-06 (табл. 3). Подібне зменшення $I^{ДНК}/I_0$ спостерігається також у випадках S-04, для якого це відношення в 3 рази менше, ніж у метилендіоксинезаміщеного Суап 40, та S-03, для якого $I^{ДНК}/I_0$ в 2,5 рази менше, ніж для ВО. В усіх трьох випадках бензотіазоловий залишок, до якого введено метилендіокси-групу, є менш електронодонорним.

Коли ж замісники, що створюють додаткові просторові ускладнення, введено до більш електронодонорного гетерозалишку — значного зменшення $I^{ДНК}/I_0$ не спостерігається, що ми бачимо на прикладі пар S-03—S-04 та ВО—Суап 40 при введенні двох метильних груп, а також пари Суап 47—S-01 при введенні метилендіокси-групи (табл. 3). Введення метилендіокси-групи до бензотіазолового залишку симетричного Суап 45 [12], після чого цей залишок стає більш електронодонорним, також значно не зменшує відношення $I^{ДНК}/I_0$ для отриманого Суап 13.

Отже, збільшення геометричних розмірів менш електронодонорного гетерозалишку негативно позначається на інтеркаляції барвників у ДНК (пари ТО—S-06, Суап 40—S-04 та В—S-03 у табл. 3), тоді як наявність подібних просторових перешкод у більш електронодонорному залишку (Суап 47—S-01, S-03—S-04 та Суап 45—Суап 13) не призводить до значного погіршення інтеркаляції таких барвників.

У випадку повної інтеркаляції, згідно з моделлю Лермана, поява просторових перешкод у будь-якому гетерозалишку негативно позначилася б на інтенсивності флюоресценції. За моделлю Прітчарда, згідно з якою основами НК перекривається лише центральна частина молекули барвника, замісники на кінцях молекули значно не впливали б на інтеркаляцію, а відтак і інтенсивність флюоресценції комплексу значно не зменшувалася б. Аналіз експериментальних даних показує, що взаємодію досліджених барвників з ДНК найкраще описує запропонована нами модель напівінтеркаляції монометинових ціанінів [27].

Автори висловлюють щире подяку В. І. Толмачову та М. А. Кудиновій за цінні поради щодо

синтезу пірилієвих та піридинієвих монометинових ціанінів.

С. С. Лукашов, М. Ю. Лосицький, С. Н. Ярмолюк,
Ю. Л. Сломинський

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 12. Новые монометиновые цианины на основе 5,6-метилендиоксибензотиазола и спектрально-люминесцентные свойства их комплексов с нуклеиновыми кислотами

Резюме

На основе ядра 5,6-метилендиоксибензотиазола синтезировано ряд новых монометиновых цианиновых красителей с гетероциклическими остатками разной геометрии и электронодонорности. Исследованы их оптические свойства в присутствии двухцепочечной ДНК, РНК и белка. Некоторые из синтезированных красителей оказались перспективными объектами для дальнейших исследований и применения в анализе нуклеиновых кислот (НК). Сравнение флуоресцентных свойств синтезированных красителей и их аналогов с незамещенным гетероостатком бензотиазола в присутствии НК позволило сделать некоторые уточнения модели полунтеркаляции монометиновых цианинов в ДНК.

S. S. Lukashov, M. Yu. Losytskii, S. M. Yarmoluk, Y. L. Slominskii

The interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 12. Novel monomethylene cyanines based on the 5,6-methylenedioxybenzothiazole and spectral-luminescent properties of their complexes with nucleic acids

Summary

Seven novel monomethylene cyanine dyes with the 5,6-methylenedioxy-benzothiazole ring fused with the heterocycles of different geometry and basicity were synthesised. Their optical properties in presence of dsDNA, RNA and protein were studied. Some of synthesised dyes are perspective objects for further investigations and applying in the NA analysis. The comparison of fluorescent properties of studied dyes and their analogues with unsubstituted benzothiazole ring in presence of nucleic acids allowed us to confirm the hypothesis of «half-intercalation» of monomethylene cyanines into dsDNA.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Haugland R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals.—Eugene: OR., 1996.—P. 144—178.
2. Lee L. G., Chen Ch.-H., Chiu L. A. Thiazole Orange: A new dye for reticulocyte analysis // Cytometry.—1986.—7.—P. 508—517.
3. 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, N 11.—P. 2803—2812.
4. Zhu Z., Chao J., Yu H., Waggoner A. S. Directly labeled DNA probes using fluorescent nucleotides with different length linkers // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 16.—P. 3418—3422.
5. Yu H., Chao J., Patek D., Mujumdar R., Waggoner A. S. Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 15.—P. 3226—3232.
6. Glazer A. N., Mathies R. A. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses // Current Opin. Biotechnol.—1997.—8, N 1.—P. 94—102.

7. Rye H. S., Drees B. L., Nelson H. C. M., Glazer A. N. Stable fluorescent dye-DNA complexes in high sensitivity detection of protein-DNA interactions // *J. Biol. Chem.*—1993.—268, N 33.—P. 25229—25238.
8. Yu H., Ernst L., Wagner M., Waggoner A. Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 1.—P. 83—88.
9. Mujumdar R. B., Ernst L. A., Mujumdar S. R., Lewis C. J., Waggoner A. S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters // *Bioconjugate Chem.*—1993.—4, N 2.—P. 105—111.
10. Deligeorgiev T. G. Molecular probes based on cyanine dyes for nucleic acid research // *Near-infrared dyes for high technology applications* / Eds S. Daehne, U. Resch-Genger, O. S. Wolfbeis.—Dordrecht etc.: Kluwer Acad. Publ., 1998.—P. 125—139.
11. 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, N 1.—P. 144—150.
12. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Smirnova T. V., Shandura M. P., Kovtun U. P., Matsuka G. Kh. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 2. Spectroscopic properties of methyleneoxy analogues of Thiazole Orange // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 12.—P. 74—81.
13. *Синтезы органических препаратов* / Под. ред. Б. А. Казанского. Пер. с англ. А. Ф. Плате.—М.: Изд.-во иностр. лит., 1953.—660 с.
14. Riegel B., Lappin G. R., Adelson B. H., Jackson R. J., Albisetti Ch. J., Dodson Jr. R. M., Baker R. H. The synthesis of some 4-quinolinols and 4-chloroquinolinols by the ethoxymethylenemalonate ester method // *J. Amer. Chem. Soc.*—1946.—68.—P. 1264—1266.
15. *Синтезы органических препаратов* / Под. ред. Б. А. Казанского. Пер. с англ. А. Ф. Плате.—М.: Изд.-во иностр. лит., 1949.—656 с.
16. Arndt F., Eistert B., Sholzimid H., Aron E. Zur Synthese der Dehydracetsaure aus Acetessigeste // *Ber.*—1936.—69, N 10, Abt. B.—S. 2373—2380.
17. *Organic Synthesis.*—New York etc.: J. Willey, 1973.—1236 p.
18. Glen K., Scharschmidt R. N-substituierte Thio- und Seleno-acridone // *Ber.*—1939.—72, N 6, Abt. B.—S. 1245—1256.
19. Hamer F. M. The chemistry of heterocyclic compounds, XVIII, The cyanine dyes and related compounds.—New York; London: Willey, 1964.—790 p.
20. Kelemen J., Wizinger R. Uber alkylsubstituierte Pyrylo- und Pyridino-cyanine I. 2,6-Dimethylpyrylo- und 2,6-Dimethylpyridino-cyanine aus 2,6-Dimethyl- γ -pyron // *Helv. Chim. Acta.*—1962.—5.—S. 1908—1917.
21. Ищенко А. А. Структура и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—232 с.
22. Larsson A., Carlsson C., Jonsson M., Albinsson B. Characterisation of the binding of the fluorescent dyes YO and YOYO to DNA by polarized spectroscopy // *J. Amer. Chem. Soc.*—1994.—116, N 19.—P. 8459—8465.
23. 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, N 5.—P. 753—760.
24. Lerman L. S. The structure of the DNA-acridine complex // *Biochemistry.*—1963.—49.—P. 94—102.
25. Rye H. S., Glazer A. N. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23, N 7.—P. 1215—1222.
26. Pritchard N. J., Blake A., Peacocke A. R. Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA // *Nature.*—1966.—212.—P. 1360—1361.
27. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Kovtun Y. P. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 5. Towards model of half-intercalation of monomethylene cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 1.—P. 75—82.

УДК 547.97

Надійшла до редакції 21.11.98