

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 7. Карбоціанінові барвники, заміщені в поліметиновому ланцюзі, як можливі зонди для флюоресцентної детекції нуклеїнових кислот

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

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

Для розширення сфери застосування карбоціанінових барвників для гомогенної флюоресцентної детекції нуклеїнових кислот (НК) запропоновано використовувати барвники, заміщені у поліметиновому ланцюзі. Синтезовано низку алкіл-заміщених похідних тіакарбоціаніну; досліджено їхні спектрально-люмінесцентні властивості в присутності дволанцюгової ДНК, РНК та бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Всі отримані похідні мають нижчий рівень власної флюоресценції, ніж у вихідного барвника. В присутності НК спостерігається підвищення інтенсивності випромінювання в 1,75–76 разів. Менше підвищення (1,75–16,9 разу) має місце в присутності великого надлишку БСА. Максимальна інтенсивність, яка більше, ніж удвічі, перевищує інтенсивність флюоресценції тіакарбоціаніну, спостерігається для НК-комплексів β -метил-заміщеного барвника. Замісники розмірів, більших за метильну групу, викликають занадто великі порушення плоскої будови флюорофору тіакарбоціаніну, що призводить до зменшення інтенсивності випромінювання НК-комплексів відповідних барвників.

Вступ. Протягом останнього часу ціанінові барвники широко використовують для флюоресцентної детекції нуклеїнових кислот (НК) [1]. Запропоновано низку ціанінів, які у вільному стані мають майже нульове значення квантового виходу, проте при зв'язуванні з НК підвищують його на два—три порядки до значень 0,2—0,9 [2]. Важливо, що присутність інших біомолекул не заважає детекції НК, оскільки не викликає значного підвищення інтенсивності випромінювання. Використання зондів на основі ціанінів дозволяє здійснювати детекцію НК у гомогенних системах, де відсутня процедура видалення надлишку зонда [3].

Частіше за все як зонди використовують похідні монометинових ціанінів, у молекулах яких відбувається просторова взаємодія гетерозалишків, через що внаслідок неплоскої геометрії флюорофора у незв'язаному стані такі барвники мають занижені значення молярного коефіцієнта екстинкції та квантового виходу флюоресценції. Інтеркаляція між основами НК або зв'язування малою борозенкою подвійної спіралі НК призводить до фіксації молекули барвника у площині, що і є основною причиною значного зростання квантового виходу. Інші класи ціанінових барвників, зокрема, карбоціаніни (КЦ), незважаючи на ряд переваг перед монометинами, мають обмежене застосування в детекції НК.

Довжини хвиль максимумів поглинання КЦ, як правило, більші за 500 нм, що дозволяє викори-

стовувати для збудження флюоресценції цих барвників дешеві напівпровідникові лазери. Заміни кінцевих гетерозалишків у молекулах КЦ, порівняно з монометинами, значно менше позначаються на випромінюючій здатності барвників. Таким чином, підбираючи гетерозалишки, легко отримати набір подібних барвників із заданими максимумами поглинання та випромінювання для багатоканальної детекції НК.

У рядах барвників з різною довжиною поліметинового ланцюга (ПЛ) найбільшою випромінюючою здатністю володіють карбо- та дикарбоціаніни [4], у зв'язку з чим як флюоресцентні мітки в аналізі НК переважно застосовуються КЦ [5—7]. Разом з тим ця обставина є причиною обмеженого використання КЦ для флюоресцентного детектування в гомогенних системах [1, 8, 9], оскільки барвники мають високий рівень випромінювання у незв'язаному з НК стані. КЦ використовували також як акцепторні хромофори у димерних флюоресцентних НК-зондах з переносом енергії [10—12].

Відомо, що заміщення в ПЛ карбоціанінів у багатьох випадках призводить до падіння значень молярного коефіцієнта екстинкції та квантового виходу [4, 13]. Отже, в такий спосіб можливо понизити небажано високий рівень випромінювання КЦ у вільному стані. Раніше нами вперше було показано, що для β -метил-заміщеного тіакарбоціаніна в присутності НК спостерігається підвищення інтенсивності власного випромінювання на два порядки [14].

З метою більш детального дослідження впливу характеру замісників у ПЛ на флюоресцентні властивості комплексів тіакарбоціаніну з НК нами синтезовано низку похідних з різними алкільними замісниками в ПЛ та досліджено їхні спектрально-люмінесцентні властивості у вільному стані та в присутності ДНК, РНК, а також білка БСА.

Матеріали і методи. Барвники. Тіакарбоціаніни синтезовано згідно з [15]. Барвники Суан 45, Суан β Et та Суан CPent отримано за допомогою ортоестерного методу (схема 1).

Решту барвників синтезували, використовуючи йодметилати відповідних солей алкільтіопохідних 3-метил-бензотіазолу (схема 2).

Будову та індивідуальність сполук підтверджено за допомогою електронної та ЯМР-Н¹-спектроскопії.

При описанні спектрів ЯМР-Н¹ використано наступні скорочення: с. — синглет, д. — дублет, д. д. — дублет дублетів, т. — триплет, к. — кuartет, м. — мультиплет, уш. с. — уширений синглет.

Суан 45 3-метил-2-[3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліден)-1-пропеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 75 %. $T_{\text{топл.}}$ 275 °С. ЯМР-Н¹: с. 3,81 (6H), д. 6,41 (2H, 12,6 Гц), д. д. 7,39 (2H, 6,3 Гц, 8,4 Гц), д. д. 7,55 (2H, 6,3 Гц, 9 Гц), м. 7,74 (3H), д. 7,98 (2H, 8,4 Гц).

Суан 2 3-метил-2-[2-метил-3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліден)-1-пропеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 94 %. $T_{\text{топл.}}$ 289 °С. ЯМР-Н¹: с. 2,58 (3H), с. 3,91 (6H), с. 6,48 (2H), д. д. 7,41 (2H, 6,75 Гц, 7,8 Гц), д. д. 7,59 (2H, 6,75 Гц, 8,1 Гц), д. 7,79 (2H, 8,1 Гц), д. 8,04 (2H, 7,8 Гц).

Суан β Et 3-метил-2-[2-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліден)-1-бутеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 67 % [16]. $T_{\text{топл.}}$ 286 °С. ЯМР-Н¹: т. 1,35 (3H, 7,95 Гц), к. 2,94 (2H, 7,95 Гц), с. 3,94 (6H), с. 6,44 (2H), д. д. 7,44 (2H, 6,9 Гц, 7,2 Гц), д. д. 7,63 (2H, 7,2 Гц, 8,4 Гц), д. 7,84 (2H, 8,4 Гц), д. 8,07 (2H, 6,9 Гц).

Суан β Pr 3-метил-2-[2-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліденметил)-1-пентеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 83 %. $T_{\text{топл.}}$ 273 °С. ЯМР-Н¹: м. 1,19 (3H), м. 1,69 (2H), м. 2,83 (2H), с. 3,91 (6H), с. 6,41 (2H), д. д. 7,40 (2H, 6,6 Гц,

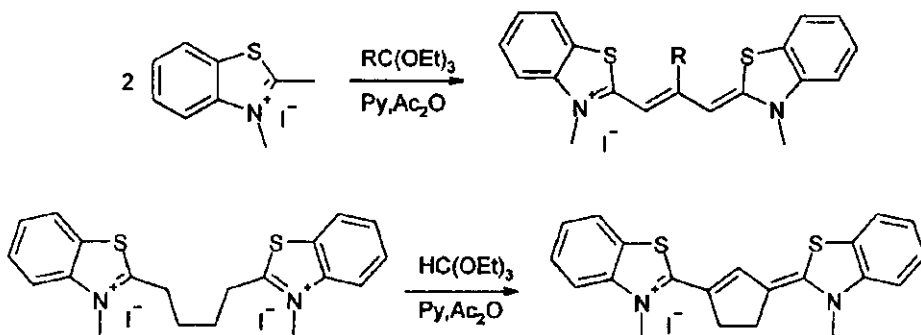


Схема 1. Синтез Суан 45 (R = H); Суан β Et (R = CH_2CH_3) і Суан CPent

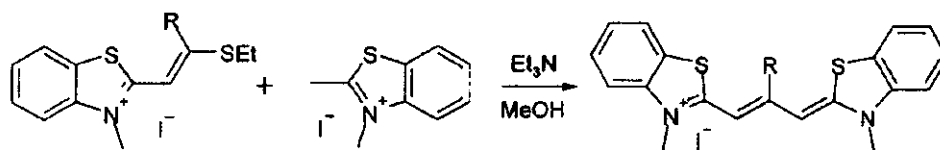


Схема 2. Синтез Суан 2 (R = -CH₃), Суан βPr (R = -CH₂CH₂CH₃), Суан βiPr (R = -CH(CH₃)₂), Суан βtBu (R = -C(CH₃)₃) і Суан βPh (R = -C₆H₅)

7,8 Гц), д. д. 7,58 (2H, 6,6 Гц, 7,8 Гц), д. 7,79 (2H, 7,8 Гц), д. 8,06 (2H, 7,8 Гц).

Суан βiPr 3-метил-2-[3-метил-2-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліден)-1-бутеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 30 %. T_{топл.} 274 °С. ЯМР-Н¹: м. 1,36 (6H), с. 3,98 (6H), уш. с. 4,42 (1H), с. 6,32 (2H), м. 7,44 (2H), м. 7,63 (2H), д. 7,87 (2H, 7 Гц), д. 8,05 (2H, 8 Гц).

Суан βtBu 2-[3,3-диметил-2-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліденметил)-1-бутеніл]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 42 %. T_{топл.} 243 °С. ЯМР-Н¹: с. 1,34 (9H), с. 3,97 (6H), с. 6,27 (2H), д. д. 7,32 (2H, 7,2 Гц, 7,8 Гц), д. д. 7,52 (2H, 7,2 Гц, 8,1 Гц), д. 7,74 (2H, 8,1 Гц), д. 7,88 (2H, 7,8 Гц).

Суан βPh 3-метил-2-[3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліден)-2-феніл-1-пропеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 23 %. T_{топл.} 278 °С. ЯМР-Н¹: уш. с. 3,90 (6H), м. 6,94 (2H), уш. с. 7,29 (2H), м. 7,47 (4H), м. 7,70—7,79 (7H).

Суан CPent 3-метил-2-[3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліден)-1-циклопентеніл]-1,3-бензотіазолій йодид. Вихід 34 %. T_{топл.} 258 °С [17]. ЯМР-Н¹: с. 2,28 (3H), с. 2,97 (4H), с. 4,08 (6H), д. 7,09 (2H, 7,95 Гц), д. д. 7,40 (2H, 7,5 Гц, 7,8 Гц), д. 7,47 (2H, 7,95 Гц), д. д. 7,59 (2H, 7,5 Гц, 8,4 Гц), д. 7,79 (2H, 8,4 Гц), д. 7,99 (2H, 7,8 Гц), с. 8,12 (1H).

Використані речовини. Повну ДНК («Sigma», США) очищено згідно з [18], отриманий зразок містив дволанцюгові фрагменти довжиною до 10³ пар основ. РНК та БСА («Sigma») використовували без додаткового очищення.

Для приготування всіх водних розчинів використовували 0,05 М трис-НСІ-буфер, рН 7,5. Диметилформамід (ДМФА) перегнано під зниженим тиском [19].

Розчини для спектральних досліджень. Використовували стокові розчини барвників у ДМФА концентрації 2·10⁻³ М, розчини НК у буфері концентрацій 6·10⁻³ М пар основ для ДНК і 1,2·10⁻² М основ для РНК.

В усіх робочих розчинах концентрація барвників становила 10⁻⁵ М. Для отримання комплексів барвників з НК стокові розчини барвників додавали до розчинів НК у буфері концентрацій 6·10⁻⁵

моль пар основ/л ДНК та 1,2·10⁻⁴ моль основ/л РНК. В отриманих розчинах співвідношення концентрацій пар основ ДНК до концентрації барвника (п. о./б.) становило 6:1, а основ РНК до барвника (о./б.)—12:1.

Робочі розчини барвників у присутності білка отримували додаванням стокових розчинів барвників до щойно приготованого розчину БСА концентрації 1 мг/мл.

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра Spcord M 40 (Німеччина). Спектри флуоресценції записували на спектрофлуориметрі Hitachi 850 (Японія). Довжину хвилі збудження флуоресценції брали рівною довжині хвилі максимуму смуги поглинання мономерів барвника в даному розчині. Всі вимірювання проводили в кварцовій кюветі 1 см × 1 см одразу після приготування розчину при кімнатній температурі. Спектри ЯМР-Н¹ отримували на приладі «Varian VXR-300», 300 МГц (США) з внутрішнім стандартом ТМС.

Результати і обговорення. Спектри поглинання барвників. Характеристики спектрів поглинання вільних барвників, а також барвників у присутності НК та білка подано в табл. 1.

Вільні барвники. Спектри поглинання розчинів вільних барвників у ДМФА у видимій області складаються з однієї смуги, довжина хвилі максимуму якої λ_{ДМФА} знаходиться в інтервалі від 542 до 595 нм. Значення молярного коефіцієнта екстинкції ε_{ДМФА} лежать у діапазоні від 0,82·10⁵ М⁻¹см⁻¹ до 1,64·10⁵ М⁻¹см⁻¹, лише для Суан βtBu воно становить 0,16·10⁵ М⁻¹см⁻¹. Крім того, спектри Суан 45, Суан βPh і Суан CPent містять на короткохвильовому боці смуги плече, що відповідає першому коливальному максимуму [4].

При переході до водного середовища (рис. 1) спектри поглинання всіх барвників, крім Суан βtBu, змінюються, причому ця зміна має певні спільні риси для всіх барвників. По-перше, довжина хвилі поглинання мономерів λ₀ зміщується на 7—14 нм у короткохвильовий бік відносно λ_{ДМФА}, а молярний коефіцієнт екстинкції в максимумі мономерної смуги ε₀ зменшується на 30—50 % порівняно з ε_{ДМФА} і становить для різних барвників від 0,57·10⁵ до 0,94·10⁵ М⁻¹см⁻¹. По-друге, в спектрах

Таблиця 1

Характеристики спектрів поглинання барвників у вільному стані та в присутності ДНК, РНК і БСА

Барвник	$\lambda_{\text{ДМФА}}$, нм	$\epsilon_{\text{ДМФА}} \cdot 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	λ_0 , нм	$\epsilon_0 \cdot 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{ДНК}}$, нм	
Суан 45	564	1,55	556	0,94	557	
	(524)	(0,6)	510	0,54	512	
	—	—	—	—	453	
Суан 2	542	1,3	533	0,68	538	
	—	—	495	0,64	510	
	—	—	(471)	(0,41)	—	
Суан βEt	546	1,36	538	0,77	540	
	—	—	500	0,7	510	
	—	—	—	—	588	
Суан βPr	548	1,2	541	0,66	544	
	—	—	503	0,63	513	
	—	—	—	—	—	
Суан βiPr	546	0,82	538	0,57	544	
	—	—	500	0,29	585	
	—	—	—	—	—	
Суан βtBu	588	0,16	588	0,16	588	
	Суан βPh	562	1,64	553	0,85	553
		(526)	(0,54)	516	0,48	521
Суан CPent	595	1,6	588	0,8	595	
	(553)	(0,46)	546	0,45	559	
	—	—	712	0,13	—	

Барвник	$\epsilon_{\text{ДНК}} \cdot 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{РНК}}$, нм	$\epsilon_{\text{РНК}} \cdot 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{БСА}}$, нм	$\epsilon_{\text{БСА}} \cdot 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Суан 45	0,65	559	0,38	556	0,89
	0,41	518	0,38	510	0,54
	0,14	485	0,32	—	—
Суан 2	0,8	539	0,51	535	0,59
	0,55	506	0,48	496	0,55
	—	—	—	(471)	(0,38)
Суан βEt	0,92, 541	0,63, 540	0,81	—	—
	0,57	507	0,58	502	0,69
	0,13	—	—	—	—
Суан βPr	1,02	544	0,58, 542	0,7	—
	0,42	513	0,48	503	0,62
Суан βiPr	0,48	542	0,46	538	0,57
	0,35	508	0,36	500	0,28
Суан βtBu	0,16	588	0,16	588	0,16
Суан βPh	0,48	556	0,51	556	1,0
	0,66	521	0,53	(521)	(0,52)
	—	—	—	—	—
Суан CPent	1,04	599	0,50	590	0,76
	0,52	560	0,44	546	0,46
	—	(526)	(0,26)	712	0,10

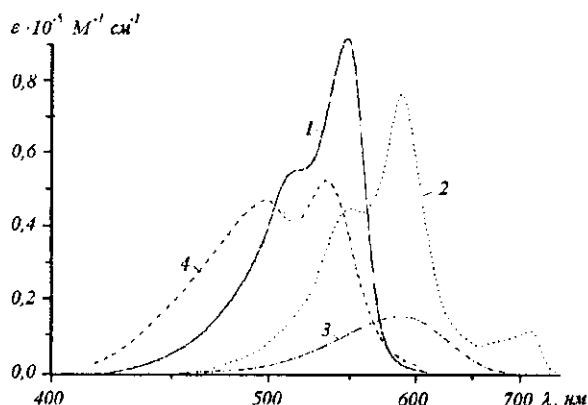


Рис. 1. Спектри поглинання вільних барвників у буфері: 1 — Суан 45; 2 — Суан СРent; 3 — Суан βtBu; 4 — Суан 2

з'являється смуга поглинання агрегатів з максимумом, гіпсохромно зсунутим на 35—46 нм від максимуму мономерної смуги. Для агрегатних смуг різних барвників значення ϵ_0 знаходяться в інтервалі від $0,29 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ до $0,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (табл. 1). У спектрі поглинання Суан СРent, окрім того, з'являється третя смуга при 712 нм (рис. 1), пов'язана, ймовірно, з утворенням у розчині J-агрегатів барвника. Про це свідчить, зокрема, довгохвильовий зсув цієї смуги відносно мономерної та її вузький контур.

Барвники в присутності нуклеїнових кислот та білка. В присутності ДНК, РНК та БСА спектри поглинання досліджуваних барвників зазнають змін порівняно із спектрами вільних барвників, за винятком Суан βtBu, спектри якого в присутності НК та білка ідентичні спектрові вільного барвника. Загальною рисою спектрів досліджуваних барвників у присутності ДНК (рис. 2) та РНК є батохромний зсув максимумів поглинання (відповідно $\epsilon_{\text{ДНК}}$ та $\epsilon_{\text{РНК}}$) відносно ϵ_0 . Цей зсув має місце як для мономерних, так і для агрегатних максимумів, не перевищує 15 нм і, очевидно, є наслідком зменшення нуклеофільності близького оточення хромофорів в утворених НК-комплексах [4].

При цьому коефіцієнти екстинкції максимумів агрегатних та мономерних смуг у спектрах поглинання змінюються по-різному. В спектрах Суан 45, Суан 2, Суан βEt, Суан βPr і Суан СРent $\epsilon_{\text{РНК}}$ мономерної та агрегатної смуг зменшуються по-

рівняно з ϵ_0 (рис. 2). В спектрах Суан βiPr і Суан βPh $\epsilon_{\text{РНК}}$ мономерної смуги зменшується, а $\epsilon_{\text{РНК}}$ агрегатної — зростає. Значення $\epsilon_{\text{ДНК}}$ мономерної смуги збільшується, а агрегатної — спадає в спектрах Суан 2, Суан βEt і Суан βPr. Для Суан βiPr і Суан βPh спостерігається зворотна картина, а в спектрі поглинання Суан СРent $\epsilon_{\text{ДНК}}$ мономерної та агрегатної смуг зростає. В спектрі Суан СРent, крім того, в присутності НК зникає J-агрегатна смуга (рис. 2). У Суан 45 $\epsilon_{\text{ДНК}}$ мономерної та агрегатної смуг зменшуються порівняно з ϵ_0 , і в короткохвильовій частині спектрів поглинання цього барвника в присутності ДНК і РНК з'являється третя смуга (відповідно на 453 і 485 нм, тобто зсунуті відповідно на 104 та 74 нм у короткохвильовий бік відносно мономерної смуги).

У спектрах Суан βEt і Суан βiPr у присутності ДНК з'являється смуга ($\approx 588 \text{ нм}$), яка зсунута в довгохвильовий бік відносно мономерної (на 41 нм для Суан βiPr і на 48 нм для Суан βEt) та відсутня як у спектрах цих барвників у присутності РНК і БСА, так і в спектрах вільних барвників (рис. 3). Значення $\epsilon_{\text{ДНК}}$ цієї смуги у випадку Суан βEt невелике ($1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, що в 7 разів менше за $\epsilon_{\text{ДНК}}$ мономерної смуги), а для Суан βiPr коефіцієнти екстинкції мономерної та «довгохвильової» смуг є порівнянними за величиною (відповідно $4,8 \cdot 10^4$ та $3,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Спектри поглинання барвників у присутності БСА подібні до спектрів вільних барвників і відрізняються лише невеликими (до 2 нм) зсувами максимумів смуг та незначними ($\pm 15 \%$) коливан-

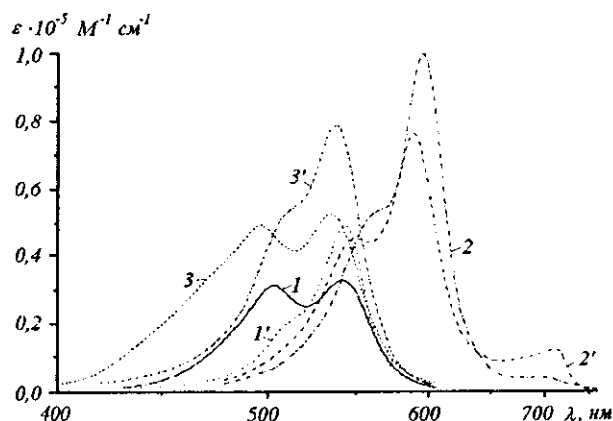


Рис. 2. Спектри поглинання вільних барвників у буфері (1—3) та барвників у присутності ДНК (1'—3'): 1, 1' — Суан βPr; 2, 2' — Суан СРent; 3, 3' — Суан 2

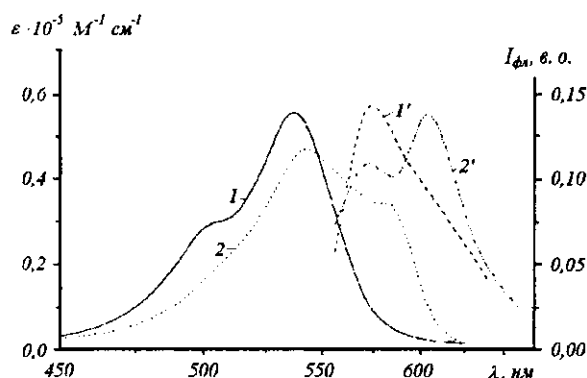


Рис. 3. Спектри поглинання та випромінювання барвника Суан βPr: 1, 1' — вільний барвник у буфері; 2, 2' — барвник у присутності ДНК; 1, 2 — спектри поглинання (ліва вісь); 1', 2' — спектри флюоресценції (права вісь; інтенсивність у відносних одиницях; спектр 2' зменшено в 20 разів)

нями значення молярного коефіцієнта екстинкції $\epsilon_{\text{БСА}}$ відносно ϵ_0 .

Флюоресцентні властивості барвників. Характеристики спектрів флюоресценції барвників у вільному стані та в присутності НК та білка представлено в табл. 2.

Вільні барвники. Водні розчини досліджуваних барвників мають близькі значення довжин хвиль максимумів випромінювання (λ_0) в інтервалі від 568 до 581 нм. Виняток становлять Суан СРепт, для якого λ_0 дорівнює 622 нм, і Суан βtBu, який взагалі не має чітко виділеного максимуму флюоресценції.

Інтенсивність випромінювання вільних заміщених барвників I_0 невисока (0,04—2,2 відносних одиниць (в. о.)) і значно менша за інтенсивність випромінювання незаміщеного Суан 45 ($I_0 = 8,1$ в. о.). Значення стоксового зсуву лежить у межах від 28 до 36 нм, а для барвника Суан 45 стоксів зсув рівний 18 нм.

Барвники в присутності НК. Загальною рисою спектрів флюоресценції досліджуваних барвників у присутності ДНК і РНК є невеликий зсув максимуму мономерної смуги випромінювання в довгохвильовий бік (значення довжин хвиль максимумів $\lambda_{\text{ДНК}}$ і $\lambda_{\text{РНК}}$ на 2—13 нм змінюється порівняно з λ_0). Винятком є лише Суан βiPr, для якого $\lambda_{\text{ДНК}}$ зсувається в короткохвильовий бік на 4 нм, та Суан βtBu, який у присутності НК та білка, як і у вільному вигляді, не має чітко виділеного максимуму випромінювання.

Присутність НК помітно збільшує інтенсивність випромінювання всіх заміщених барвників, окрім Суан βtBu. Відношення інтенсивності мономерної смуги флюоресценції барвника в присутності ДНК і РНК до інтенсивності флюоресценції вільного барвника (відповідно $I_{\text{ДНК}}/I_0$ та $I_{\text{РНК}}/I_0$) має різні значення. Так, для Суан 2 спостерігається високе значення співвідношення $I_{\text{ДНК}}/I_0$ (65,0), тоді як рівень флюоресценції Суан 45 і Суан βtBu практично не змінюється ($I_{\text{ДНК}}/I_0$ рівне відповідно 1,06 та 1,75). Для решти барвників співвідношення $I_{\text{ДНК}}/I_0$ має значення від 6,0 до 16,7. Значення $I_{\text{РНК}}/I_0$ досить високе для Суан 2 (76,0) і Суан βiPr (48,7), для Суан 45 і Суан βtBu воно низьке (1,94 та 1,75 відповідно), а для решти барвників лежить в інтервалі від 6,5 до 28,0. Слід зазначити, що для Суан 2 і Суан СРепт $I_{\text{ДНК}}$ та $I_{\text{РНК}}$ приблизно рівні, а для Суан βEt, Суан βPr, Суан βiPr і Суан βPh $I_{\text{РНК}}$ перевищує $I_{\text{ДНК}}$ у 2—3 рази.

У спектрах флюоресценції Суан βEt, Суан βPr і Суан βiPr у присутності ДНК зафіксовано другу смугу, зсунуту на 23—35 нм у довгохвильовий бік відносно мономерної (рис. 3). Відношення інтенсивності цієї смуги до мономерної становить 1,2 для Суан βiPr, 1,1 — для Суан βPr та 0,9 — для Суан βEt. За допомогою спектрів збудження флюоресценції встановлено, що для Суан βiPr і Суан βEt ця довгохвильова смуга флюоресценції відповідає смугі поглинання при 588 нм. Для Суан βPr спектр збудження також вказує на існування подібної смуги поглинання, але в спектрі поглинання вона чітко не виділяється. Можливо, до появи цих смуг призводить утворення J-агрегатних комплексів барвника з подвійною спіраллю ДНК, на зразок тих, що спостерігалися для ДНК-комплексу псевдоізоціаніну [20]. Іншою причиною може бути одночасна фіксація у ДНК-комплексах окремих конформерів цих барвників у співвідношенні, відмінному від того, що існує в рівновазі у розчинах вільних барвників [13].

Випромінювання барвників у присутності білка. В присутності БСА для всіх барвників (крім Суан βtBu) спостерігається зсув положення максимумів флюоресценції ($\lambda_{\text{БСА}}$) на 5—13 нм у довгохвильовий бік відносно λ_0 . Зростання інтенсивності флюоресценції порівняно з I_0 ($I_{\text{БСА}}/I_0$) досить високе для Суан βPh — 16,9 і менше для решти барвників — 1,75—6,9. При цьому слід зазначити, що для Суан СРепт $I_{\text{БСА}}$ приблизно рівне $I_{\text{ДНК}}$ та $I_{\text{РНК}}$, а для Суан βPh $I_{\text{БСА}}$ за значенням близьке до $I_{\text{РНК}}$ і майже втричі перевищує $I_{\text{ДНК}}$.

Досліджувані барвники як можливі флюоресцентні зонди для визначення ДНК. КЦ виявляють

Таблиця 2

Характеристики спектрів флюоресценції барвників у присутності нуклеїнових кислот і білка

Барвник	λ_0 , нм	I_0 , в. о.	$\lambda_{\text{ДНК}}$, нм	$I_{\text{ДНК}}$, в. о.	$I_{\text{ДНК}}/I_0$	$\lambda_{\text{РНК}}$, нм
Суан 45	574	8,1	581	8,6	1,06	587
Суан 2	568	0,32	572	20,8	65	577
Суан βEt	571	0,6	573	7,5	12,5	580
	—	—	600	6,8	11,3	—
Суан βPr	569	1,3	575	10,6	8,2	581
	—	—	598	11,4	8,8	—
Суан βiPr	574	0,15	570	2,5	16,7	580
	—	—	605	3,1	20,7	—
Суан βtBu	—	0,04	—	0,07	1,75	—
Суан βPh	581	1,3	584	7,8	6,0	589
Суан CPent	622	2,2	630	13,6	6,2	632

Барвник	$I_{\text{РНК}}$, в. о.	$I_{\text{РНК}}/I_0$	$\lambda_{\text{БСА}}$, нм	$I_{\text{БСА}}$, в. о.	$I_{\text{БСА}}/I_0$
Суан 45	15,6	1,94	582	14,2	1,76
Суан 2	24,3	76,0	576	2,2	6,9
Суан βEt	16,8	28,0	580	3,4	5,7
Суан βPr	23,5	18,1	579	5,8	4,5
Суан βiPr	7,3	48,7	582	0,4	2,7
Суан βtBu	0,07	1,75	—	0,07	1,75
Суан βPh	19,0	14,6	591	22,0	16,9
Суан CPent	14,3	6,5	630	15,0	6,8

певну спорідненість до НК. Про це свідчать наступні явища. По-перше, в спектрах поглинання представлених барвників у присутності НК спостерігається bathochromний зсув максимумів поглинання до 15 нм (табл. 1), що, як правило, відбувається при збільшенні гідрофобності близького оточення барвника [4]. По-друге, в спектрах більшості з барвників відбувається зменшення інтенсивності агрегатних смуг поглинання (рис. 3). Отже, для барвників у водному розчині взаємодія з НК є не менш вигідною, ніж агрегування. По-третє, в присутності НК рівень флюоресценції всіх барвників, за винятком Суан 45 і Суан βtBu , значно збільшується, що є наслідком фіксації флюорофорів у НК-комплексах, утворених з достатнім виражем енергії (табл. 2).

Як уже зазначалося, основною перешкодою для застосування КЦ у гомогенній детекції НК є висока інтенсивність їхнього випромінювання у не-

зв'язаному з НК стані. Заміщення в ПЛ значно зменшило рівень власного випромінювання тіакарбоціаніну (табл. 2). В комплексі з НК інтенсивність випромінювання заміщених барвників зростає і не лише досягає, а й перевищує інтенсивність випромінювання незаміщеного Суан 45. При цьому розмір замісника має дуже важливе значення, що впливає з порівняння $I_{\text{ДНК}}$ серії β -заміщених тіакарбоціанінів. Так, метильна група не тільки не заважає, а, навпаки, сприяє жорсткій фіксації плоскої конформації флюорофора в ДНК-комплексі, про що свідчать високі значення $I_{\text{ДНК}}/I_0$ та $I_{\text{РНК}}/I_0$ (відповідно 65 та 76).

Для барвників з первинними замісниками більших розмірів етил- та *n*-пропіл- спостерігаються вдвічі менші значення $I_{\text{ДНК}}$ та $I_{\text{РНК}}$ і менші значення $I_{\text{ДНК}}/I_0$ та $I_{\text{РНК}}/I_0$ (табл. 2). Приблизно такі ж значення $I_{\text{НК}}$ та $I_{\text{НК}}/I_0$ (табл. 2) спостерігаються і для β -феніл-заміщеного барвника, що обумовлено

плоскою будовою фенільного залишку, який займає менший об'єм, ніж вторинні алкільні замісники. Вторинна β i-ізо-пропільна група створює вже надмірні просторові перешкоди, так що навіть висока спорідненість до НК, яка проявляється у високих значеннях $I_{\text{ДНК}}/I_0$ (16,0—20,7) та $I_{\text{РНК}}/I_0$ (48,7), недостатня для фіксації плоскої конформації, і такий барвник має низький рівень випромінювання і в комплексах з НК ($I_{\text{ДНК}} = 2,5$ —3,1, а $I_{\text{РНК}} = 7,3$). Розмір *трет*-бутильного замісника вже настільки великий, що з сильно ускладненої ди-*цис*-(EZZE)-конформації [13] його не здатні вивести ні присутність у розчині білка, ні взаємодія з НК, оскільки форма смуги поглинання та інтенсивність флюоресценції залишаються практично незмінними (табл. 1 і 2).

КЦ порівняно з монометиновими ціанінами мають дещо більшу схильність до неспецифічної взаємодії з біомолекулами, а також є чутливішими до в'язкості середовища. Для досліджених КЦ значення $I_{\text{БСА}}/I_0$ в середньому більше тих, що спостерігалися в аналогічному білковому розчині для більшості монометинів [21], а для Суап β Ph і Суап SRent воно взагалі перевищує приріст інтенсивності випромінювання в присутності НК (табл. 2). Проте для решти барвників, зважаючи на високу концентрацію білка, рівень випромінювання КЦ у присутності білка можна вважати допустимим. Так, для Суап 2 $I_{\text{ДНК}}$ та $I_{\text{РНК}}$ на порядок перевищують $I_{\text{БСА}}$.

Висока інтенсивність флюоресценції ДНК- та РНК-комплексів, її приріст майже на два порядки при зв'язуванні, максимум поглинання понад 500 нм роблять барвник Суап 2 перспективним для використання у флюоресцентній детекції НК. Введення замісників до ПЛ ціанінів відкриває шлях до отримання цілої низки нових флюоресцентних НК-зондів з максимумами поглинання в більше 500 нм.

S. S. Lukashov, M. Yu. Losytsky, Yu. L. Slominskii,
S. M. Yarmoluk

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 7. Carbocyanine dyes, substituted in polymethine chain, as possible probes for fluorescent nucleic acid detection

Summary

To extend the application of carbocyanine dyes in fluorescent nucleic acid detection, the use of dyes substituted in a polymethine chain is proposed. A series of thiocarbocyanine derivatives with alkyl substituents in a polymethine chain have been synthesized, and the spectral luminescent properties of dyes in the presence of double-stranded DNA, RNA and bovine serum albumin (BSA) have been examined. The intrinsic fluorescence of all derivatives prepared is lower than that of unsubstituted thiocarbocyanine. The dyes show 1.75-76-fold fluorescence enhancement in the presence of nucleic acids. Lower enhancement (1.75-16.9 times) takes place in the

presence of large excess of BSA. The highest fluorescence intensity for dye-nucleic acid complexes is observed for the *i*-methyl-substituted dye that is more than two times higher as compared to thiocarbocyanine. The substituents larger than methyl group disturb the planarity of thiocarbocyanine fluorophore excessively, and the fluorescence intensities of nucleic acid complexes of corresponding dyes are lower.

S. S. Lukashov, M. Yu. Losytsky, Yu. L. Slominskii,
S. M. Yarmoluk

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 7. Карбоцианиновые красители с заместителями в полиметиновой цепи как потенциальные зонды для флюоресцентной детекции нуклеиновых кислот

Резюме

В целях расширения использования карбоцианиновых красителей для гомогенного флюоресцентного обнаружения нуклеиновых кислот (НК) предложено использование красителей с заместителями в полиметиновой цепи. Синтезирован ряд алкил-замещенных производных тиокарбоцианина; исследованы их спектрально-люминесцентные характеристики в присутствии двухцепочечной ДНК, РНК и бычьего сывороточного альбумина (БСА). Уровень собственной флюоресценции у всех полученных производных ниже, чем у исходного красителя. В присутствии НК наблюдается увеличение интенсивности излучения в 1,75—76 раз, в то время как уровень излучения незаменного красителя повышается незначительно (1,08—1,94 раза). Меньшее увеличение флюоресценции (1,75—16,9 раза) имеет место в присутствии большого избытка БСА. Максимальная интенсивность, вдвое превышающая таковую тиокарбоцианина, наблюдается для НК-комплексов β -метил-замещенного красителя. Заместители больших, чем метильная группа, размеров вызывают избыточные нарушения планарности тиокарбоцианинового флюорофора, что приводит к уменьшению интенсивности излучения НК-комплексов соответствующих красителей.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Haugland R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals.—Eugene: OR, 1996.—680 p.
- Deligeorgiev T. G. Molecular probes based on cyanine dyes for nucleic acid research // Near-Infrared Dyes for High Technology Applications. NATO ASI / Eds S. Daehne, U. Resch-Genger, O. S. Wolfbeis.—Kluwer: Acad. publ., 1998.—P. 125—139.
- Mayer A., Neuenhofer S. Luminescent labels — more than just an alternative to radioisotopes // Angew. Chem. Int.—1994.—33.—P. 1044—1072.
- Ищенко А. А. Строеение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—232 с.
- Mujumdar R. B., Ernst L. A., Mujumdar S. R., Lewis C. J., Waggoner A. S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocarbocyanine succinimidyl esters // Bioconjugate Chem.—1993.—4, N 2.—P. 105—111.
- Yu H., Chao J., Patek D., Mujumdar R., Waggoner A. Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 15.—P. 3226—3232.
- 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.
- Van Hooijdonk C. A. E. M., Glade C. P., Van Erp P. E. J.

- TO-PRO-3 iodide: A novel HeNe laser-excitable DNA stain as an alternative for Propidium iodide in multiparameter flow cytometry // *Cytometry*.—1994.—17.—P. 185—189.
9. Milanovich N., Sun M., Jankowiak R. Binding of TO-PRO-3 and TOTO-3 to DNA: Fluorescence and hole-burning studies // *J. Phys. Chem.*—1996.—100, N 21.—P. 9181—9186.
 10. Glazer A. N., Mathies R. A. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses // *Current Opin. Biotechnol.*—1997.—8, N 1.—P. 94—102.
 11. Benson S. C., Mathies R. A., Glazer A. N. Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: Stability and application of the DNA complexes // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21, N 24.—P. 5720—5726.
 12. Benson S. C., Singh P., Glazer A. N. Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: Synthesis and spectroscopic properties // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21, N 24.—P. 5727—5735.
 13. Tyutyulkov N., Fabian J., Mehlhorn A., Dietz F., Tadjer A. Polymethine dyes. Structure and properties.—Sofia: St. Kliment Ohridsky Univ. press, 1991.—250 p.
 14. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Lukashov S. S., Slominskii Y. L. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XII. β -substituted carbocyanines as possible fluorescent probes for nucleic acid detection // *Biol. and Med. Chem. Lett.*—1999.—9, N 12.—P. 1677—1678.
 15. Hamer F. M. The cyanine dyes and related compounds // *The chemistry of heterocyclic compounds. XVIII.*—New York; London: J. Wiley, 1964.—790 p.
 16. Brooker L. G. S., White F. L. Studies in the cyanine dye series. II. Carbocyanines with substituents in the three carbon chain // *J. Amer. Chem. Soc.*—1935.—57.—P. 2480—2488.
 17. Ушенко И. К. α , γ -полиметилентиакробоцианины // *Укр. хим. журн.*—1948.—14, № 1.—С. 50—72.
 18. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.—458 p.
 19. *Органикум* / Пер. с нем.—М.: Мир, 1992.—Т. 2.—474 с.
 20. Norden B., Tjernelund F. Optical studies on complexes between DNA and pseudoisocyanine // *Biophys. Chem.*—1977.—6.—P. 31—45.
 21. Лукашов С. С., Лосицький М. Ю., Ярмолюк С. М., Сломінський Ю. Л. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 12. Нові монометинові ціаніни на основі 5,6-метилендіоксibenзогіазолу та спектрально-люмінесцентні властивості їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 6.—С. 562—572.

УДК 535.372

Надійшла до редакції 17.06.99