

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. Мезо-метилзаміщені триметинціанінові барвники як можливі зонди для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот

С. С. Лукашов, І. Є. Маковенко, М. Ю. Лосицький,
Ю. Л. Сломінський¹, С. М. Ярмолюк

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

Продовжуючи дослідження раніше запропонованих для гомогенної флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот (НК) мезо-метилзаміщених триметинціанінів, синтезовано низку мезо-метилзаміщених барвників з різними гетероциклічними залишками. Досліджено спектрально-люмінесцентні властивості отриманих барвників та незаміщених аналогів у присутності дволанцюгової ДНК, РНК та бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Мезо-метил-похідні мають значно нижчий рівень власної флуоресценції у порівнянні з відповідними незаміщеними барвниками, що особливо добре простежується в розчині ДМФА. У присутності НК для мезо-метилтриметинціанінів спостерігається підвищення інтенсивності випромінювання в 2–102 рази, для незаміщених барвників — лише в 1–10,5 разу. При цьому метильна група збільшує жорсткість фіксації молекули барвника в комплексі так, що в присутності НК інтенсивність флуоресценції мезо-заміщених барвників у 3–5 разів перевищує таку відповідних незаміщених барвників у ДМФА та в НК-комплексах. У присутності великого надлишку БСА спостерігається підвищення інтенсивності випромінювання в 1,2–9,6 разу. Найбільш гідрофобні барвники із залишком нафтотіазолу схильні до неспецифічної взаємодії з біомолекулами і підвищення інтенсивності їхньої флуоресценції в присутності БСА становить 2,2–114 разів.

Вступ. Останнім часом для детекції нуклеїнових кислот (НК) усе ширше використовують флуоресцентні зонди на основі ціанінових барвників [1, 2]. Гнучкість поліметинового ланцюга (складової частини флуорофору) надає ціанінам унікальну властивість — підвищення квантового виходу їхньої флуоресценції при зв'язуванні з НК на два—три порядки [1, 3]. Присутність інших біомолекул не викликає значного підвищення інтенсивності випромінювання ціанінів і не заважає детекції НК. За допомогою зондів на основі згаданих барвників стає зручною детекція НК у гомогенному середовищі в присутності значного надлишку зонда [1, 4, 5].

Як зонди звичайно використовують похідні монометинових ціанінів. У молекулах останніх відбувається безпосередній контакт розташованих поруч гетероциклічних залишків, що спричиняє неплоску геометрію флуорофору у нез'язаному стані барвника і пов'язане з цим зниження значень молярного коефіцієнта екстинкції та квантового виходу флуоресценції [6, 7]. У комплексі з НК фіксується планарна конформація молекули барвника, яка супроводжується значним підвищенням квантового виходу. При збільшенні довжини поліметинового ланцюга просторова взаємодія гетерозалишків і неплоска геометрія молекул втрачаються, тому такі барвники мають достатньо високу власну флуоресценцію. Через це ціаніни з довшим

поліметиновим ланцюгом обмежено застосовуються в гомогенних процедурах детекції НК.

Відомо, що алкільні замісники в поліетиновому ланцюгу триметинових ціанінів просторово контактують з гетерозалишками [6, 7]. Це виводить молекули триметинів з плоскої конформації подібно до монOMETINІВ та значно знижує їхнє власне випромінювання. Нами показано, що введення метильної групи до мезоположення поліетинового ланцюга тіакарбоціаніну підвищує інтенсивність випромінювання барвника при зв'язуванні з ДНК та РНК майже на два порядки [8]. Зростання флуоресценції для незаміщеного тіакарбоціаніну близьке до одиниці, а відносна інтенсивність випромінювання більш ніж удвічі поступається інтенсивності випромінювання НК-комплексів мезо-метилзаміщеного барвника [8].

При дослідженні низки мезо-заміщених похідних тіакарбоціаніну з'ясовано, що замісником оптимальних розмірів є метильна група, а групи більших розмірів надмірно порушують плоску конформацію флуорофору та заважають зв'язуванню з НК [9].

Отримані дані стосувалися лише тіакарбоціаніну — триметинціаніну з гетероциклічними залишками бензотіазолу [8, 9]. Чи має така закономірність зниження власного випромінювання і збільшення випромінювання НК-комплексів загальний характер і чи поширюється вона на інші триметинціаніни? В даній роботі синтезовано пари незаміщених барвників — мезо-метилзаміщених барвників для триметинціанінів із гетерозалишками бензооксазолу, бензоселеназолу, [1,2]-d-нафтотіазолу та [2,1]-d-нафтотіазолу. Охарактеризовано їхні спектрально-люмінесцентні властивості у вільному стані та в присутності ДНК, РНК, а також білка БСА.

Матеріали і методи. Барвники. Тіакарбоціаніни синтезовано на основі методик, наведених у монографії [10]. Барвники отримали за допомогою ортоестерного методу (схема).

Будову та індивідуальність сполук підтверджено за допомогою електронної та ЯМР N^1 спектроскопії. При описанні спектрів ЯМР N^1 використано такі скорочення: с. — синглет; д. — дублет; д.

д. — дублет дублетів; т. — триплет; к. — кuartет; м. — нерозділений мультиплет.

J3 (Cyan 45) 3-метил-2-[3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-ілден)-1-пропеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 75 %. $T_{\text{топл}}$ 275 °C. ЯМР N^1 : 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) [9].

J4 (Cyan 2) 3-метил-2-[2-метил-3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-ілден)-1-пропеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій йодид. Вихід 94 %. $T_{\text{топл}}$ 289 °C. ЯМР N^1 : 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) [9].

J5 3-метил-2-(3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензооксазол-2-ілден)-1-пропеніл)-1,3-бензооксазол-3-ій йодид. Вихід 75 %. $T_{\text{топл}}$ 305 °C. ЯМР N^1 : 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).

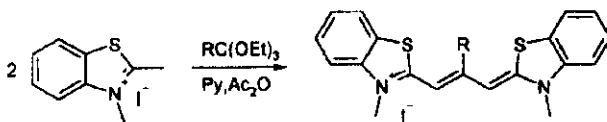
J6 3-метил-2-(2-метил-3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензооксазол-2-ілден)-1-пропеніл)-1,3-бензооксазол-3-ій йодид. Вихід 14 %. $T_{\text{топл}}$ 265 °C. ЯМР N^1 : с. 2,55 (3H), с. 3,94 (6H), с. 6,67 (2H), д. д. 7,41 (2H, 7,6 Гц, 8,5 Гц), д. д. 7,62 (2H, 7,6 Гц, 7,9 Гц), д. 7,83 (2H, 8,5 Гц), д. 8,16 (2H, 7,9 Гц).

J7 3-метил-2-(3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензоселеназол-2-ілден)-1-пропеніл)-1,3-бензоселеназол-3-ій метилметосульфат. Вихід 89 %. $T_{\text{топл}}$ 95 °C, розкл. ЯМР N^1 : с. 3,38 (3H), с. 3,79 (6H), д. 6,72 (2H, 12,4 Гц), д. д. 7,32 (2H, 6,6 Гц, 8,5 Гц), д. д. 7,52 (2H, 6,6 Гц, 8,9 Гц), д. 7,66 (2H, 8,5 Гц), д. 7,74 (1H, 12,4 Гц), д. 8,07 (2H, 8,9 Гц).

J8 3-метил-2-(2-метил-3-(3-метил-2,3-дигідро-1,3-бензоселеназол-2-ілден)-1-пропеніл)-1,3-бензоселеназол-3-ій йодид. Вихід 33 %. $T_{\text{топл}}$ 138 °C, розкл. ЯМР N^1 : с. 3,74 (6H), с. 6,64 (2H), д. д. 7,29 (2H, 6,4 Гц, 8,5 Гц), д. д. 7,48 (2H, 6,4 Гц, 8,8 Гц), д. 7,62 (2H, 8,5 Гц), д. 8,03 (2H, 8,8 Гц).

J9 1-метил-2-(3-(1-метил-1,2-дигідронафто(1,2-d)(1,3)тіазол-2-ілден)-1-пропеніл)нафто(1,2-d)(1,3)тіазол-1-ій метилметосульфат. Вихід 83 %. $T_{\text{топл}}$ 273 °C. ЯМР N^1 : с. 3,38 (3H), с. 4,27 (6H), д. 6,67 (2H, 12,4 Гц), д. д. 7,62 (2H, 6,2 Гц, 8,0 Гц), д. д. 7,72 (2H, 6,2 Гц, 8,9 Гц), д. 7,78 (1H, 12,4 Гц), д. 7,96 (2H, 8,9 Гц), м. 8,05 (4H), д. 8,66 (2H, 8,9 Гц).

J10 (Stains-All) 1-метил-2-(2-метил-3-(1-метил-1,2-дигідронафто(1,2-d)(1,3)тіазол-2-ілден)-1-пропеніл)нафто(1,2-d)(1,3)тіазол-1-ій бромід. Вихід 40 %. $T_{\text{топл}}$ 262 °C. ЯМР N^1 : с. 2,63 (3H), с. 4,21 (6H), с. 6,43 (2H), м. 7,73 (4H), д. 7,91 (2H, 8,7 Гц), м. 8,05 (4H), д. 8,66 (2H, 8,6 Гц).



Синтез барвників за ортоестерним методом [10]

J11 3-метил-2-(3-(3-метил-2,3-дигідронафто(2,1-d)(1,3)тіазол-2-іліден)-1-пропеніл)нафто(2,1-d)(1,3)тіазол-3-ій бромід. Вихід 64 %. $T_{\text{топл}}$ 240 °С. ЯМР H^1 : с. 3,71 (6H), д. 6,41 (2H, 12,4 Гц), м. 7,22 (6 H), д. д. 7,39 (2H, 6,3 Гц, 8,4 Гц), д. 7,53 (2H, 9,3 Гц), д. 7,79 (1H, 12,4 Гц), д. 7,95 (2H, 9,3 Гц), д. 8,38 (2H, 8,6 Гц).

J12 3-метил-2-(2-метил-3-(3-метил-2,3-дигідронафто(2,1-d)(1,3)тіазол-2-іліден)-1-пропеніл)нафто(2,1-d)(1,3)тіазол-3-ій бромід. Вихід 27 %. $T_{\text{топл}}$ 229 °С. ЯМР H^1 : с. 2,63 (3H), с. 3,73 (6H), с. 6,32 (2H), м. 7,28 (6H), м. 7,59 (4H), д. 8,15 (2H, 8,6 Гц).

Використані речовини. Повну ДНК («Sigma», США) очищено відповідно до роботи [11], отриманий зразок містив дволанцюгові фрагменти довжиною до 10^3 пар основ. РНК та БСА («Sigma») використовували без додаткового очищення.

Усі водні розчини готували за допомогою 0,05 М трис-НСІ буфера, рН 7,5. Диметилформамід (ДМФА) перегнано під зниженим тиском.

Розчини для спектральних досліджень. Використовували стокові розчини барвників у ДМФА концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ М та розчини НК у буфері концентрації $6 \cdot 10^{-3}$ М пар основ (п. о.) для ДНК і $1,2 \cdot 10^{-2}$ М основ для РНК.

В усіх робочих розчинах концентрація барвників дорівнювала 10^{-5} М. Для отримання комплексів барвників з НК стокові розчини барвників додавали до розчинів НК у буфері з концентраціями $6 \cdot 10^{-5}$ моль п. о./л ДНК та $1,2 \cdot 10^{-4}$ моль о./л РНК. В отриманих розчинах співвідношення концентрації п. о. 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 з концентрацією 1 мг/мл.

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра *Sperecord M 40* (Німеччина). Запис спектрів флуоресценції здійснювали на спектрофлуориметрі «*Caru Eclipse*» (Австралія). Флуоресценцію збуджували випромінюванням з довжиною хвилі, що відповідає максимуму смуги поглинання барвника в ДМФА. Усі вимірювання проводили в кварцовій кюветі (11 см) відразу після приготування розчину при кімнатній температурі. Спектри ЯМР H^1 реєстрували на приладі «*Varian VXR-300*», 300 МГц (США) відносно внутрішнього стандарту ТМС.

Результати і обговорення. Власні оптичні характеристики барвників. Характеристики спектрів поглинання та випромінювання вільних барвників наведено в табл. 1.

Спектри поглинання розчинів барвників у розчині ДМФА у видимій області складаються з однієї смуги, довжина хвилі максимуму якої $\lambda^{\text{ДМФА}}$ знаходиться в інтервалі від 466 до 598 нм. Значення молярного коефіцієнта екстинкції $\epsilon^{\text{ДМФА}}$ лежать у діапазоні від $0,11 \cdot 10^5$ до $1,66 \cdot 10^5$ $M^{-1} \text{cm}^{-1}$. На короткохвильовому боці смуг поглинання більшості барвників проявляється плече, яке відповідає першому коливальному максимумові [7].

При переході до водного середовища (рис. 1, 2) спектри поглинання барвників сильно змінюються.

Барвники агрегують, і в спектрах поглинання з'являються додаткові смуги. Максимуми поглинання $\lambda^{\text{вільн}}$, які відповідають мономерам барвника, зміщуються на 7—30 нм у короткохвильовий бік від $\lambda^{\text{ДМФА}}$, а молярний коефіцієнт екстинкції в максимумі мономерної смуги $\epsilon^{\text{вільн}}$ зменшується на 30—50 % порівняно з $\epsilon^{\text{ДМФА}}$ і становить для різних барвників від $0,07 \cdot 10^5$ до $1,15 \cdot 10^5$ $M^{-1} \text{cm}^{-1}$. Асоціати барвників мають різноманітну будову. В спектрах барвників J3—J8 як збільшення оптичної густини короткохвильового плеча основної смуги проявляються лише Н-агрегати (рис. 1) [1, 6, 7]. Оптична густина в агрегатних смугах становить приблизно половину і лише в спектрі J7 досягає значення оптичної густини мономерного максимуму барвника $\epsilon^{\text{вільн}}$ (табл. 1). Барвники J9—J12, молекули яких більш гідрофобні, утворюють значно складніший набір асоціатів (рис. 2). У їхніх спектрах присутні не лише смуги, що відповідають Н-агрегатам із зміщеними на 30—50 нм у короткохвильову область відносно мономерного максимуму, а й смуги поглинання, зміщені на 50 і більше нм у довгохвильову область, які відповідають J-агрегатним структурам [1, 6, 7]. Більшу схильність до утворення J-агрегатів виявляють мезо-метилзаміщені барвники. Так, спектр барвника J10 складається переважно з вузької смуги J-агрегату з оптичною густиною, яка майже вдвічі перевищує оптичну гуστину його розчину в ДМФА (табл. 1).

Максимуми хвиль випромінювання барвників у ДМФА $\lambda^{*\text{ДМФА}}$ лежать в інтервалі 507—627 нм. Стокові зсуви мають значення 17—42 нм. У спектрах флуоресценції водних розчинів барвників J7—J12 присутні не лише мономерні смуги ($\lambda^{*\text{вільн}}$ 498—604 нм), а також смуги J-агрегатів з максимумами при 656—732 нм.

За розглянутими характеристиками пари барвників різняться між собою, проте в кожній з пар у мезо-заміщеного та незаміщеного барвників властивості подібні. Наявність метильної групи в складі поліметинового ланцюга відбивається лише на інтенсивності флуоресценції барвників. Це особливо помітно в розчинах ДМФА, де відсутня агре-

Таблиця 1

Характеристики спектрів поглинання та випромінювання барвників у вільному стані у водному розчині та в диметилформаміді

| Барвник | Хімічна структура барвника | Барвник у водному розчині | | | | Барвник у диметилформаміді | | | | |
|---------------------|----------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------|---------------|------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | $\lambda_{\text{вільн}}$, нм | $\epsilon_{\text{вільн}} \cdot 10^3$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ | $\lambda_{\text{вип}}$, нм | I_0 , в. о. | $\lambda_{\text{ДМФА}}$, нм | $\epsilon_{\text{ДМФА}} \cdot 10^3$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ | $\lambda_{\text{вДМФА}}$, нм | $I_{\text{ДМФА}}$, в. о. | $I_{\text{ДМФА}}/I_0$ |
| J3 Суван 45 | | 512 | 0,54 | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 553 | 0,94 | 571 | 272 | 561 | 1,36 | 582 | 621 | 2,3 |
| J4 Суван 2 | | 497 | 0,45 | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 554 | 0,60 | 564 | 13,5 | 542 | 1,00 | 575 | 27 | 2 |
| J5 | | 457 | 0,62 | — | — | 466 | 0,65 | — | — | — |
| | | 479 | 0,99 | 498 | 455 | 489 | 1,06 | 507 | 866 | — |
| J6 | | 461 | 0,62 | — | — | 468 | 0,63 | — | — | — |
| | | 485 | 1,15 | 504 | 94 | 492 | 1,24 | 511 | 134 | 1,9 |
| J7 | | 511 | 0,16 | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 589 | 0,15 | 714 | 2 | 597 | 1,22 | 627 | 960 | 480 |
| J8 | | 560 | 0,07 | 583 | 14 | 570 | 0,11 | 620 | 64 | 4,6 |
| | | 607 | 0,03 | — | — | — | — | 587 | 42 | 3 |
| J9 | | 514 | 0,2 | — | — | 563 | 0,93 | — | — | — |
| | | 585 | 0,2 | — | — | 598 | 1,66 | 627 | 787 | 291 |
| J10 Става -АН | | — | — | — | — | 575 | 1,00 | 618 | 43 | 1,8 |
| | | 645 | 1,98 | 656 | 24 | — | — | — | — | — |
| J11 | | 528 | 0,34 | — | — | 558 | 0,59 | — | — | — |
| | | 617 | 0,07 | 604 | 2 | 595 | 1,26 | 621 | 1400 | 700 |
| J12 | | — | — | 695 | 1,1 | — | — | — | — | — |
| | | 531 | 0,54 | — | — | 573 | 0,77 | 606 | 49 | 7,3 |
| | | 631 | 0,13 | 672 | 6,7 | — | — | — | — | — |
| | | — | — | 732 | 2,6 | — | — | — | — | — |

Примітка. $\lambda_{\text{вільн}}$ — максимум поглинання у водному буфері; $\epsilon_{\text{вільн}}$ — молярний коефіцієнт екстинкції у водному буфері; $\lambda_{\text{вип}}$ — максимум випромінювання у водному буфері; I_0 — інтенсивність випромінювання у водному буфері; $\lambda_{\text{ДМФА}}$ — максимум поглинання в диметилформаміді; $\epsilon_{\text{ДМФА}}$ — молярний коефіцієнт екстинкції в ДМФА, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\lambda_{\text{вДМФА}}$ — максимум випромінювання в диметилформаміді, нм; $I_{\text{ДМФА}}$ — інтенсивність випромінювання в ДМФА, в. о.; $I_{\text{ДМФА}}/I_0$ — співвідношення інтенсивностей випромінювання в ДМФА та у водному розчині

гація барвників. Інтенсивність випромінювання $I_{\text{ДМФА}}$ барвників з метильною групою в 6,5—29 разів менша, ніж $I_{\text{ДМФА}}$ незаміщених барвників (рис. 1, 2). Асоціація барвників у водному середовищі значно (в 2—700 разів) знижує інтенсивність їхнього випромінювання I_0 (рис. 1, 2). Зменшення

інтенсивності випромінювання відбувається для всіх барвників, при цьому різниця в I_0 між заміщеними та незаміщеними барвниками нівелюється. Якщо в парах барвників J3/J4 та J5/J6 відповідно 20- і 5-разова перевага I_0 незаміщеного барвника зберігається, то мезо-заміщені барвники J10 та J12

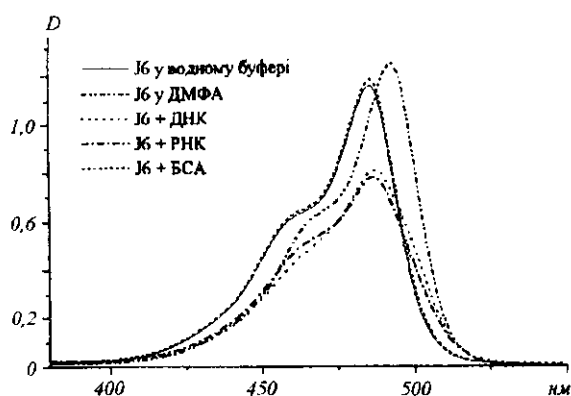


Рис. 1. Спектри поглинання барвника J6

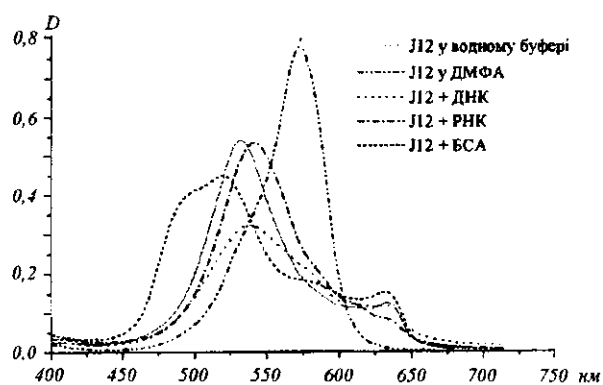


Рис. 2. Спектри поглинання барвника J12

випромінюють у 2—3 рази сильніше за незаміщені J9 та J11.

Оптичні характеристики барвників у присутності ДНК, РНК та білка БСА. У табл. 2 наведено характеристики спектрів випромінювання барвників у присутності ДНК, РНК і БСА.

За наявності ДНК, РНК і БСА спектри поглинання досліджуваних барвників зазнають змін порівняно із спектрами вільних барвників. Загальною рисою спектрів досліджуваних барвників у присутності ДНК і РНК є батохромний зсув максимумів поглинання відносно $\lambda^{\text{вільн}}$ до 15 нм. Очевидно, він є наслідком зменшення нуклеофільності близького оточення хромофорів в утворених комплексах з НК [7]. Крім того, спостерігається збільшення оптичної густини для смуг мономерів та її зменшення для смуг агрегатів (рис. 3, 4).

Від додавання до розчину білка спектри поглинання барвників майже не змінюються.

Максимуми флуоресценції барвників у присутності ДНК $\lambda^{\text{ДНК}}$, РНК $\lambda^{\text{РНК}}$ і БСА $\lambda^{\text{БСА}}$ лежать у межах 500—623 нм. У спектрах випромінювання сполук J9—J12 смуги випромінювання J-агрегатів при 657—701 нм у присутності НК втрачають інтенсивність, проте не зникають. Інтенсивність випромінювання барвників у присутності ДНК і РНК зростає, так що отримані величини $I^{\text{ДНК}}$ та $I^{\text{РНК}}$ перевищують I_0 в 1—102 рази (табл. 2). У присутності БСА інтенсивність флуоресценції $I^{\text{БСА}}$ досягає лише 1,2—9,6 значення I_0 , а величина підвищення рівня випромінювання $I^{\text{БСА}}/I_0$ для заміщених і незаміщених барвників майже не відрізняється. Виняток становлять барвники J11 та J12. Для них у присутності БСА величина $I^{\text{БСА}}/I_0$ на

довжині хвилі молекулярного максимуму дорівнює відповідно 65 та 15,5 разу, а на агрегатному — 114 і 40 разів. У випадку барвника J11 значення $I^{\text{БСА}}/I_0$ значно перевищує підвищення інтенсивності в присутності ДНК $I^{\text{ДНК}}/I_0$ та РНК $I^{\text{РНК}}/I_0$, а у випадку J12 — значення $I^{\text{РНК}}/I_0$ (табл. 2).

Для всіх барвників у присутності НК простежується чітка закономірність: інтенсивність флуоресценції незаміщених барвників зростає не вище, ніж до $I^{\text{ДМФА}}$ (табл. 1), а величина $I^{\text{НК}}$ заміщених барвників у 3—5 разів перевищує $I^{\text{НК}}$ та $I^{\text{ДМФА}}$ відповідних заміщених барвників (табл. 1, 2). Таким чином, введення метильної групи призводить не лише до падіння рівня власного випромінювання барвника. Очевидно, метильна група сприяє більш жорсткій фіксації молекули і відповідно підвищенню здатності до випромінювання барвника в НК-комплексі. Отже, для незаміщених барвників $I^{\text{ДНК}}/I_0$ складає лише 1—2,9 разу, а $I^{\text{РНК}}/I_0$ 1,5—10,5 разу. Для мезо-метилзаміщених барвників характерним є зростання інтенсивності при зв'язуванні більш ніж на порядок, $I^{\text{ДНК}}/I_0$ складає вже 2—102 рази, а $I^{\text{РНК}}/I_0$ — 6,7—93 рази (табл. 2).

Досліджені барвники як можливі флуоресцентні зонди для визначення ДНК. Найважливішою властивістю флуоресцентних зондів для гомогенної детекції НК є значне збільшення інтенсивності випромінювання при зв'язуванні ($I^{\text{НК}}/I_0$). Введення метильної групи до мезо-положення поліметинового ланцюга значно покращує таку властивість триметинових ціанінових барвників. При введенні замісника рівень власного випромінювання розглянутих триметинціанінів у розчині ДМФА падає в 7—29 разів. У комплексах з НК барвники, напав-

Таблиця 2

Характеристики спектрів випромінювання барвників у присутності ДНК, РНК та білка бичачого сироваткового альбуміну БСА

| Барвник | Барвник у присутності ДНК | | | Барвник у присутності РНК | | | Барвник у присутності БСА | | |
|--------------|---------------------------|-------------------|---------------|---------------------------|-------------------|---------------|---------------------------|-------------------|---------------|
| | $\lambda^{*ДНК}$, нм | $I^{ДНК}$, в. о. | $I^{ДНК}/I_0$ | $\lambda^{*РНК}$, нм | $I^{РНК}$, в. о. | $I^{РНК}/I_0$ | $\lambda^{*БСА}$, нм | $I^{БСА}$, в. о. | $I^{БСА}/I_0$ |
| J3 (Суан 45) | 576 | 297 | 1 | 584 | 590 | 2,6 | 576 | 383 | 1,4 |
| J4 (Суан 2) | 566 | 1380 | 102 | 573 | 1268 | 93 | 573 | 90,5 | 6,7 |
| J5 | 511 | 872 | 1,9 | 509 | 982 | 2,15 | 500 | 566 | 1,2 |
| J6 | 514 | 2600 | 27 | 515 | 2250 | 23 | 508 | 135 | 1,4 |
| J7 | 619 | 5,9 | 2,9 | 623 | 7,6 | 4 | 622 | 19,3 | 9,6 |
| J8 | 575 | 88,8 | 6,3 | 587 | 173 | 12 | 586 | 91 | 6,5 |
| J9 | 615 | 2,38 | 1 | 623 | 4,2 | 1,5 | 622 | 9,6 | 3,5 |
| J10 | 597 | 49 | 2 | 607 | 264 | 11 | 608 | 53,7 | 2,23 |
| Stains-All | 701 | 19 | 0,79 | 660 | 112 | 4,6 | 657 | 28,6 | 1,19 |
| J11 | 612 | 4,5 | 2,25 | 618 | 21 | 10,5 | 613 | 131 | 65 |
| | 700 | 1,5 | 1,36 | — | — | 19 | — | — | 114 |
| J12 | 591 | 510 | 76 | 600 | 56 | 6,7 | 605 | 104 | 15,5 |
| | 637 | 104 | 40 | — | — | 21 | — | — | 40 |

Примітка. $\lambda^{*ДНК}$ — максимум випромінювання в присутності ДНК, нм; $I^{ДНК}$ — інтенсивність випромінювання в присутності ДНК, у відносних одиницях (в. о.); $I^{ДНК}/I_0$ — збільшення інтенсивності випромінювання в присутності ДНК; $\lambda^{*РНК}$ — максимум випромінювання в присутності РНК, нм; $I^{РНК}$ — інтенсивність випромінювання в присутності РНК, в. о.; $I^{РНК}/I_0$ — збільшення інтенсивності випромінювання в присутності РНК; $\lambda^{*БСА}$ — максимум випромінювання в присутності БСА, нм; $I^{БСА}$ — інтенсивність випромінювання в присутності БСА, в. о.; $I^{БСА}/I_0$ — збільшення інтенсивності випромінювання в присутності БСА.

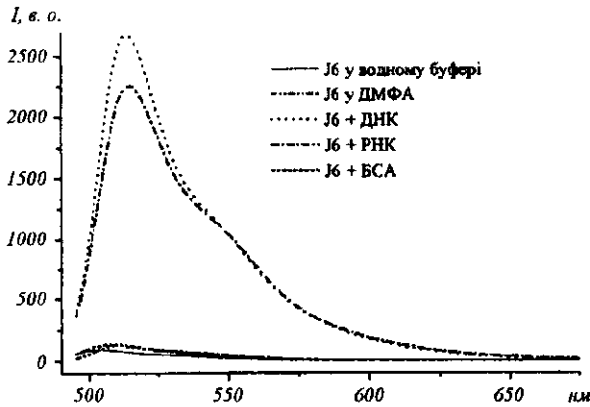


Рис. 3. Спектри випромінювання барвника J6

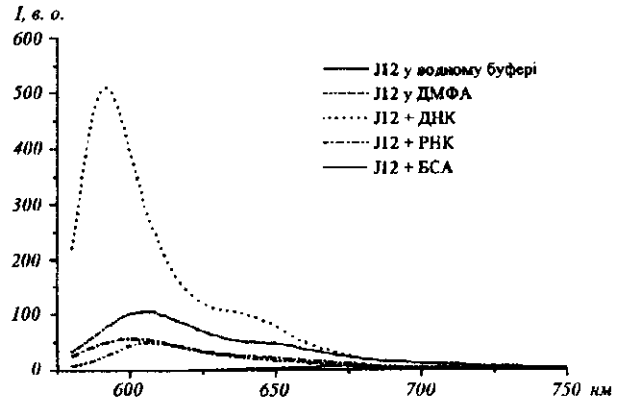


Рис. 4. Спектри випромінювання барвника J12

ки, випромінюють у 3—5 разів інтенсивніше, ніж незаміщені аналоги. З урахуванням характерного для барвників агрегатоутворення у водних розчинах у присутності НК підвищення інтенсивності випромінювання мезо-метилтриметинціанінів становить 10—100 разів на відміну від щонайбільше

10 разів для незаміщених барвників. Явище має загальний характер, спостерігається для барвників з гетерозалишками різної будови і є ефективним засобом для отримання флуоресцентних зондів для гомогенного визначення НК з максимумами поглинання/випромінювання в області 500—700 нм.

Комплексоутворення з НК у водному розчині супроводжується асоціацією барвників, особливо схильними до якої є найгідрофобніші барвники J9—J12 з ядрами нафтотіазолу. Ці барвники утворюють широкий спектр асоціатів, значна частина яких зберігається і в присутності нуклеїнових кислот. Висока гідрофобність сполук J9—J12 спричинює втрату загальної специфічності до НК. Незважаючи на подібну хімічну структуру, барвник J10 специфічно взаємодіє з РНК, а J12, навпаки, з ДНК. Крім того, сполуки J9—J12 мають підвищену спорідненість до інших біомолекул, зокрема, білка БСА.

S. S. Lukashov, I. E. Makovenko M. Yu. Losytskyy, Yu. L. Slominskii, S. M. Yarmoluk

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. Meso-methylsubstituted trimethincyanines, as possible probes for fluorescent nucleic acid detection

Summary

Continuing the study of meso-substituted trimethincyanines proposed earlier for the homogeneous fluorescent nucleic acids detection, a series of meso-methyltrimethincyanines with different heterocyclic residues was synthesized. The spectral-luminiscent properties of the dyes obtained in the presence of DNA, RNA and bovine serum albumine (BSA) were studied and compared with unsubstituted analogues. The intrinsic fluorescence of meso-methyl derivatives is much lower than that of unsubstituted dyes. The fluorescence enhancement upon binding with nucleic acids for meso-substituted dyes is up to 102 times while for the unsubstituted dyes it is only 10.5 times. A methyl group not only decreases the intrinsic fluorescence of the dyes, but its presence leads to more strict fixation of the dye molecule in the nucleic acid complex. As a result, the fluorescence of the meso-methyltrimethincyanines nucleic acids complexes is 3—5-fold higher than the fluorescence intensity of the corresponding unsubstituted dyes in DMF solution and within the nucleic acids complexes. In the presence of large BSA excess the protein dyes show only 1.2—9.6 fold increase of the fluorescence intensity. The most hydrophobic dyes with naphthothiazole residue are inclined to interact unspecifically with other biomolecules and their fluorescence enhancement in the BSA presence is 2.2—114 times.

С. С. Лукашов, И. Е. Маковенко, М. Ю. Лосицкий, Ю. Л. Сломинский, С. М. Ярмолюк

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. Мезо-метилзамещенные триметинцианиновые красители как возможные зонды для флуоресцентной детекции нуклеиновых кислот

Резюме

В продолжение исследования ранее предложенных для гомогенной флуоресцентной детекции нуклеиновых кислот (НК) мезо-метилзамещенных триметинцианинов синтезирован ряд мезо-метилзамещенных красителей с разными гетероциклическими остатками. Для полученных красителей исследованы спектрально-люминесцентные свойства в присутствии двухцепочечной ДНК, РНК и бычьего сывороточного альбумина

(БСА). Мезо-метилпроизводные по сравнению с соответствующими незамещенными красителями обладают значительно меньшим уровнем собственной флуоресценции, что особенно хорошо прослеживается в растворе ДМФА. В присутствии НК для мезо-метилтриметинцианинов наблюдается повышенные интенсивности излучения в 2—102 раза, для незамещенных красителей оно составляет лишь 1—10,5 раза. При этом метильная группа способствует жесткой фиксации молекулы красителя в комплексе, так что в присутствии НК интенсивность флуоресценции мезо-замещенных красителей в 3—5 раз превышает таковую соответствующих незамещенных красителей в ДМФА и в НК-комплексах. В присутствии большого избытка БСА наблюдается меньше чем с НК повышение интенсивности излучения — в 1,2—9,6 раза. Наиболее гидрофобные красители с остатком нафтотиазола склонны к неспецифическому взаимодействию с биомолекулами, повышение интенсивности их флуоресценции в присутствии БСА составляет 2,2—114 раз.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Haugland R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals // Sixth ed.—Eugene: OR., 1996.—680 p.
2. Zhu H., Clark S. M., Benson S. K., Rye H. S., Glazer A. N. High-sensitivity capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using monomeric and dimeric fluorescent intercalating dyes // Anal. Chem.—1994.—66, N 13.—P. 1941—1948.
3. Deligeorgiev T. G. Molecular probes based on cyanine dyes for nucleic acid research // Near-Infrared Dyes for High Technology Applications. NATO ASI Series / Eds S. Daehne, U. Resch-Genger, O. S. Wolfbeis.—Dordrecht: Kluwer Acad. publ., 1998.—P. 125—139.
4. Livache T., Fouque B., Teoule R. Detection of HIV 1 DNA in biological samples by an homogeneous assay: fluorescence measurement of double-stranded RNA synthesized from amplified DNA // Anal. Biochem.—1994.—217.—P. 248—254.
5. Schneeberger C., Speiser P., Kury F., Zeillinger R. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain // PCR Meth. and Appl.—1995.—4.—P. 234—238.
6. Tyutyulkov N., Fabian J., Mehthorn A., Dietz F., Tadjer A. Polymethine dyes. Structure and properties.—Sofia: St. Kliment Ohridsky Univ. press, 1991.—250 p.
7. Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—232 с.
8. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Lukashov S. S., Slominskii Yu. 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.
9. Лукашов С. С., Лосицкий М. Ю., Сломинский Ю. Л., Ярмолюк С. М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 7. Карбоціанінові барвники, заміщені в поліметиновому ланцюзі, як можливі зонди для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот // Біополімери і клітина.—2001.—17, № 2.—С. 169—177.
10. Hater F. M. The chemistry of heterocyclic compounds. 18. The cyanine dyes and related compounds.—New York; London: J. Willey, 1964.—790 c.
11. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1982.—458 p.

УДК 535.372

Надійшла до редакції 21.08.2000