

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. Новий (піридо)(тіо)триметинціаніновий барвник ССуап 40 для флуоресцентного мічення олігонуклеотидів

С. М. Ярмолук, М. Ю. Лосицький¹, В. Б. Ковальська,
С. М. Томачинський, Т. Ю. Огульчанський¹,
О. М. Костенко, В. В. Курдюков², О. І. Толмачев²

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

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Просп. Глушкова, 6, Київ, 03022, Україна

² Інститут органічної хімії НАН України
Вул. Мурманська, 5, Київ, 02094, Україна

E-mail: otava@carrier.kiev.ua

Досліджено спектрально-люмінесцентні характеристики карбоціанінового барвника ССуап 40 у вільному стані та в присутності ДНК і полінуклеотидів. Барвник має високе значення молярного коефіцієнта екстинкції ($5,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) та середній квантовий вихід (0,042). У присутності ДНК, poly(dGC/dGC) та poly(dA/dT) квантовий вихід ССуап 40 зростає в 5,5; 3,8 та 1,8 рази відповідно. ССуап 40 пропонується для флуоресцентного мічення олігонуклеотидів в умовах реакції, запропонованої нами раніше.

Вступ. Сучасне широке поширення молекулярно-біологічних технологій вимагає швидких та зручних методів детекції певних нуклеотидних послідовностей. Як зонди з цієї метою часто застосовують мічені флюорофором олігонуклеотиди, комплементарні досліджуваній ділянці нуклеїнової кислоти (НК) [1–3]. Детекція з використанням традиційних процедур обов'язково потребує розділення гібридизованого з НК та негібридизованого зондів, що позначається на швидкості та вартості аналізу [1]. Одним з підходів до вдосконалення методу детекції нуклеотидних послідовностей НК є використання чіп-технологій (DNA chip), у яких досліджувана ДНК фіксується певним чином на твердій основі. В результаті цього з'являється мож-

ливість швидко відокремлювати негібридизований зонд рідинним потоком, тоді як гібридизований зонд фіксується разом з досліджуваною ДНК [2].

Принципово іншим підходом до специфічного визначення певних нуклеотидних послідовностей НК є гомогенна детекція, при якій сигнал від негібридизованого зонда є набагато меншим, ніж від гібридизованого, внаслідок чого немає необхідності позбуватися залишку незв'язаного зонда. Зокрема, такий підхід використовується в «молекулярних маяках» (molecular beacons), у яких до одного кінця олігонуклеотиду кон'юговано флюорофор, а до іншого — гасник флуоресценції. У випадку негібридизованого олігонуклеотиду гасник знаходиться близько від флюорофору і гасить його випромінювання. При гібридизації з комплементарною послідовністю олігонуклеотид випрямляється, флюорофор та гасник опиняються на значній від-

© С. М. ЯРМОЛУК, М. Ю. ЛОСИЦЬКИЙ, В. Б. КОВАЛЬСЬКА,
С. М. ТОМАЧИНСЬКИЙ, Т. Ю. ОГУЛЬЧАНСЬКИЙ,
О. М. КОСТЕНКО, В. В. КУРДЮКОВ,
О. І. ТОЛМАЧЕВ, 2002

стані один від одного і інтенсивність випромінювання флюорофора значно зростає [1, 3, 4].

«Спалахуючі зонди» (light-up probes) для гомогенної детекції певних послідовностей ДНК були створені на основі монометинціанінових барвників, які підвищують інтенсивність флуоресценції в присутності дволанцюгової (дл) ДНК. Під терміном «спалахуючий зонд» мають на увазі олігонуклеотид, мічений флуоресцентним барвником [1]. При кон'югації з комплементарними ділянками ДНК такі зонди на основі монометинцевого ціаніну тіазолового оранжевого (ТО) підвищували інтенсивність флуоресценції до 50 разів [1]. При використанні зондів на основі оксазолового жовтого (ЮО) для гомогенного кількісного моніторингу транскрипції *in vitro* спостерігалось 2—3-разове підвищення інтенсивності випромінювання, лінійно залежне від збільшення концентрації РНК [5].

Раніше нами запропоновано високофлуоресцентний монометинціанін Суап 40 для візуалізації та детекції НК [6]. Розроблено просту і зручну процедуру флуоресцентного мічення олігонуклеотидів з використанням цього барвника. Слабофлуоресцентний пірилієвий ціаніновий барвник (Суап 39) при реакції з аміногрупою аміноалкіл-модифікованого олігонуклеотиду перетворювався у високофлуоресцентний піридинієвий барвник, похідний від Суап 40 [7]. При утворенні комплементарних комплексів кон'югата T_{15} -Суап 40 з одностанцюговими гомополімерами poly(rA) та poly(dA) інтенсивність флуоресценції зростала в 1,9 та 2,1 разу відповідно [7].

Отже, реальне підвищення флуоресценції «спалахуючих зондів» із монометинціанінами виявилось значно нижчим від очікуваного, що поряд з низькою інтегральною інтенсивністю робить їх малопридатними для практичного використання. Низькі значення зростання інтенсивності флуоресценції при зв'язуванні з НК кон'югата порівняно з окремим флюорофором є наслідком підвищення власного квантового виходу флюорофора в кон'югаті через взаємодію з олігонуклеотидним фрагментом. Крім того, згадані вище монометини ТО, ЮО та Суап 40 є інтеркаляторами [8—10], а лінкер, що поєднує барвник з олігонуклеотидом, очевидно, заважає інтеркаляції молекули барвника у дволанцюгову ділянку, яка утворюється при гібридації олігонуклеотиду з ДНК.

Відомо, що триметинціанінові (карбоціанінові) барвники, як правило, мають більшу інтенсивність флуоресценції, ніж аналогічні монометини [11]. Крім того, в літературі є відомості про борозенкову взаємодію карбоціанінів з длДНК [12, 13]. Можна очікувати, що кон'югація з олігонуклеотидом не

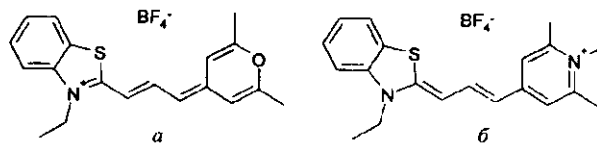


Рис. 1. Структурні формули карбоціанінових барвників ССуап 39 (а) та ССуап 40 (б)

буде перешкоджати борозенковій взаємодії флюорофора з дволанцюговою ділянкою ДНК. Тому має сенс використовувати карбоціанінові барвники для конструювання «спалахуючих зондів».

Нещодавно [7] нами синтезовано триметиниові аналоги барвників Суап 39 та Суап 40: пірилієвий ССуап 39 та піридинієвий ССуап 40 (рис. 1). Показано, що ці барвники можуть бути використані для флуоресцентного мічення олігонуклеотидів аналогічно до Суап 39 та Суап 40 (неопубліковані дані).

Мета даної роботи полягала у вивченні спектральних властивостей синтезованого карбоціанінового барвника ССуап 40 у розчині у вільному стані та в присутності ДНК і на підставі отриманих даних розглянути можливість його застосування для конструювання «спалахуючих зондів».

Матеріали і методи. *Матеріали.* Диметилформамід (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), етанол, трис(оксиметил)амінометангідрохлорид (ТРИС) («Укрреакхім», Україна) використано без додаткового очищення. В роботі використаний буфер 0,05 М трис-НСІ (рН 7,5). Тотальну ДНК з еритроцитів курчат («Sigma Chemical Co.», США) додатково очищено фенольною екстракцією. Застосовано дволанцюгові полінуклеотиди poly(dA/dT) та poly(dGC/dGC) («Sigma Chemical Co.»).

Методи синтезу барвників. 2,6-диметил-4-[3-(3-етил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-ліден)-1-пропеніл]пірилії перхлорат (ССуап 39). Суміш 0,105 г (0,5 ммоль) 2,4,6-триметилпірилії тетрафторборату, 0,218 г (0,5 ммоль) йодиду 2[2-(ацетанілідовініл-1)]-3-етилбензотіазолію та 0,05 г (0,5 ммоль) триетиламіну в 5 мл абсолютного етанолу кип'ятили протягом 1 год, після чого охолоджували та відфільтровували. Барвник хроматографували на Al_2O_3 в CH_2Cl_2 . Фракцію, що містила кінцевий продукт, упарювали на роторному випарювачі. Вихід становив 0,102 г (51 %, етанол). $T_{\text{розкл}}$ 230—231 °С (з розкл). Спектр ПМР, δ (м. д.): 1,48 (т., $j = 7,2$ Гц, 3Н, CH_2CH_2D), 2,17 (с., 3Н, CH_3), 2,36 (с., 3Н, CH_3), 4,61 (кв., $j = 7,2$ Гц, 2Н, CH_2), 6,09 (д., $j = 13$ Гц, α Н ланцюга), 6,15 (уш. с., 1Н, β Н пірилію), 6,92 (д., $j = 13,6$ Гц, α' Н ланцюга), 7,24 (уш. с., 1Н, β' Н пірилію), 7,32—7,43 (м., 1Н,

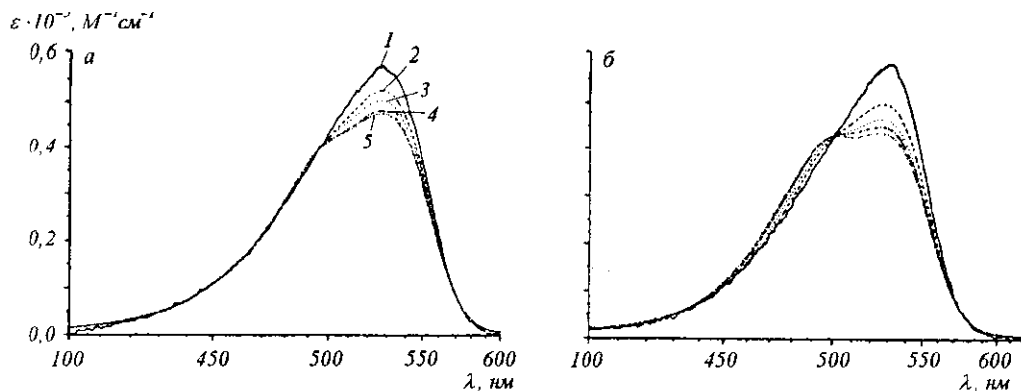


Рис. 2. Спектри поглинання барвника ССуап 40 в буфері (а) та в присутності 0,5 М NaCl (б): 1 — 10^{-6} М; 2 — 10^{-5} М; 3 — $2 \cdot 10^{-5}$ М; 4 — $3 \cdot 10^{-5}$ М; 5 — $4 \cdot 10^{-5}$ М

ArH), 7,48—7,54 (м., 2H, ArH), 7,91 (д., $j = 8,0$ Гц, 1H, ArH), 8,12 (т., $j = 13$ Гц, 1H, мезо Н ланцюга).

1,2,6-триметил-4-[3-(3-етил-2,3-дигідро-1,3-бензотіазол-2-іліден)-1-пропіл]піридиній перхлорат (ССуап 40). Суміш 0,06 г (0,15 ммоль) пірилоціаніну та 1 мл 10 %-го розчину метиламіну в метанолі кип'ятили у 4 мл метанолу протягом 1 год, після чого охолоджували. Барвник осаджували водним розчином NH_4BF_4 , відфільтровували та промивали водою. Вихід становив 0,038 г (62 %, метанол). Спектр ПМР, δ (м. д.): 1,47 (т., $j = 7,2$ Гц, 3H, CH_2CH_2), 2,63 (с., 3H, CH_3), 2,91 (с., 3H, CH_3), 3,8 (с., 3H, NCH_3), 4,68 (кв., $j = 7,2$ Гц, 2H, CH_2), 6,25 (д., $j = 13$ Гц, α Н ланцюга), 7,1 (д., $j = 13$ Гц, α' Н ланцюга), 7,25 (уш. с., 2H, β Н піридинію), 7,38—7,45 (т., 1H, ArH), 7,49—7,61 (м., 2H, ArH), 7,94 (д., 1H, ArH), 8,1 (т., $j = 13$ Гц, 1H, мезо Н ланцюга).

Позначення в спектрах ЯМР ^1H : с. — синглет; д. — дублет; т. — триплет; кв. — кватрет; м. — нерозділений мультиплет; уш. с. — уширений синглет; δ — хімічний зсув; j — константа спінової взаємодії.

Приготування розчинів. Стокові розчини НК концентрації $8 \cdot 10^{-3}$ М (моль пар основ на літр) готували в буфері. Стокові розчини барвників концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ М були приготовлені в ДМФА. Робочі розчини вільного барвника отримували розведенням його стокового розчину буфером, ДМФА, ДМСО чи етанолом до потрібної концентрації. Розчини барвника в присутності НК одержували розведенням стокового розчину НК у буфері до необхідної концентрації та подальшим додаванням необхідної кількості стокового розчину барвника. Для отримання розчину з підвищеною іонною силою потрібний робочий розчин (вільного барвника чи барвника в присутності НК) готували, як описано, в розчині NaCl в буфері. Всі робочі розчини готували безпосередньо перед вимірюваннями.

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі Specord 40 М (Німеччина). Спектри флуоресценції записували за допомогою спектрофлуориметра Hitachi 850 (Японія). Квантові виходи флуоресценції розраховували, використовуючи флуоресцеїн як стандарт [14]. Спектри ПМР реєстрували на спектрометрі VXR-300 «Varian», розчинник CDCl_3 . Всі вимірювання виконували при кімнатній температурі.

Результати і обговорення. Спектри поглинання ССуап 40. Спектри поглинання розчинів барвника ССуап 40 у буфері в діапазоні концентрацій від 10^{-6} до $4 \cdot 10^{-5}$ М представлено на рис. 2, а. Для найменшої з досліджених концентрацій 10^{-6} М спектр складається з однієї смуги з максимумом на довжині хвилі $\lambda_{\text{abs}} = 529$ нм. Враховуючи низьку концентрацію барвника та характерну форму смуги, можна пов'язати її з поглинанням мономерних молекул ССуап 40.

При збільшенні концентрації барвника в спектрі поглинання спостерігаються зміни (рис. 2, а), що відповідають утворенню агрегатів барвника. Максимум спектра поглинання агрегатів при цьому λ_{abs} зсунутий у короткохвильову область спектра порівняно з λ_{abs} мономерів. Агрегати, які характеризуються подібним спектральним зсувом, мають сендвічеву структуру та часто спостерігаються у водних розчинах ціанінових барвників [15—18]. Підвищення іонної сили водного розчину, як правило, сприяє агрегації катіонних ціанінових барвників [16]. У спектрі поглинання розчинів ССуап 40 у присутності 0,5 М NaCl спостерігається чіткіше розділена агрегатна смуга, максимум якої знаходиться близько 495 нм (рис. 2, б).

У присутності НК в спектрах поглинання ССуап 40 спостерігаються зміни (батохромний зсув λ_{abs} та гіпохромізм), що свідчать про взаємодію мономерних молекул ССуап 40 з НК (рис. 3, а—в). При цьому присутність у розчині ДНК (рис. 3, а) чи

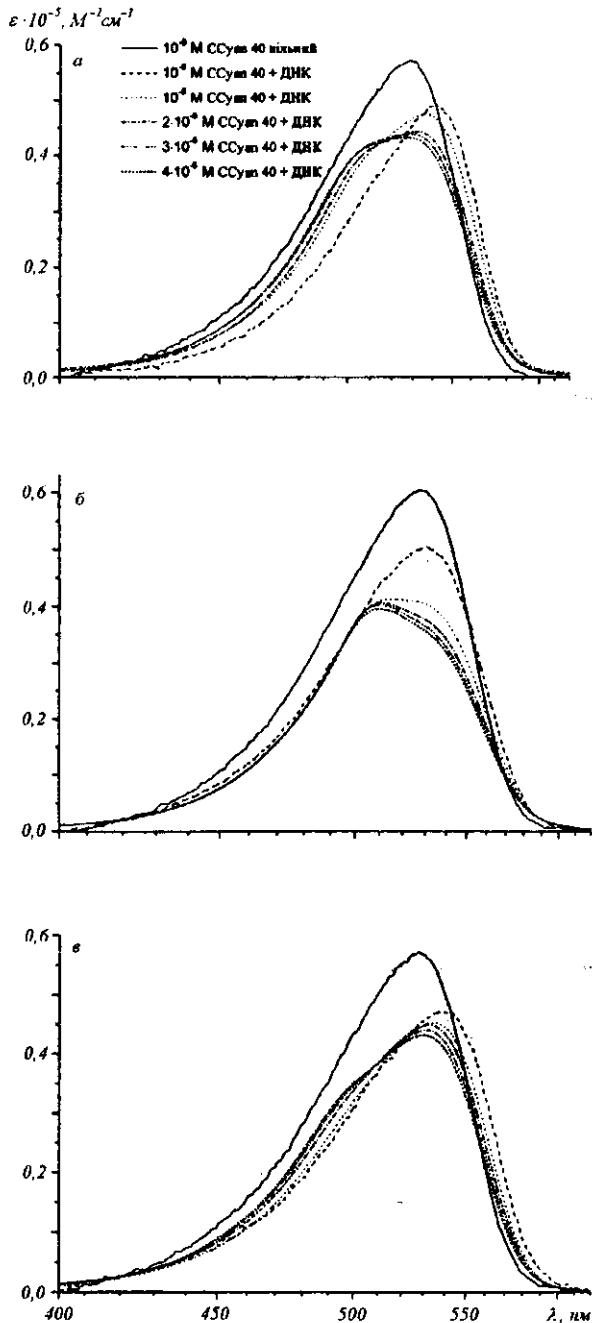


Рис. 3. Спектри поглинання барвника ССуан 40 у присутності ДНК (а), poly(dA/dT) (б) та poly(dGC/dGC) (в). Концентрації НК рівні $6 \cdot 10^{-5}$ М пар основ

poly(dGC/dGC) (рис. 3, в) спричинює значно більший зсув λ_{abs} (на 12 та 11 нм відповідно), ніж присутність poly(dA/dT) (рис. 3, б, зсув λ_{abs} становить 2 нм), що вказує на деяку відмінність у зв'язуванні барвника з ДНК різного нуклеотидного складу.

При зростанні співвідношення концентрації барвника до концентрації пар основ ДНК (барвник/п. о.) в спектрах поглинання ССуан 40 проявляється агрегатна смуга, зсунута в короткохвильовий бік відносно мономерної. При цьому у випадку poly(dGC/dGC) агрегатна смуга проявляється лише у вигляді плеча (рис. 3, в), у випадку ДНК вона майже зрівнюється за інтенсивністю з мономерною смугою при барвник/п. о. = 0,5 (рис. 3, а), а для poly(dA/dT) — перевищує мономерну вже при барвник/п. о. $\approx 0,17$, а після значення барвник/п. о. $\approx 0,33$ домінує в спектрі поглинання (рис. 3, б). Принаймні для випадку poly(dA/dT) можна стверджувати, що агрегати утворені на молекулі НК. Свідченням цього є, по-перше, те, що спектр агрегатів у присутності poly(dA/dT) є значно інтенсивнішим, ніж для вільного барвника, і, по-друге, наявність близько 495 нм ізобестичної точки, через яку проходять усі спектри поглинання ССуан 40 у присутності полінуклеотиду, але не проходить спектр вільного барвника (рис. 3, б). Отже, для poly(dA/dT) зв'язані молекули ССуан 40 мають значно більшу схильність до утворення агрегатів з вільними молекулами барвника, ніж це має місце у випадку poly(dGC/dGC) та ДНК. Слід зазначити, що про утворення агрегатів карбоціанінових барвників на НК повідомлялося в низці робіт [13, 19, 20].

Таким чином, спектри поглинання ССуан 40 у присутності НК вказують на відмінність зв'язування мономерів барвника з poly(dA/dT) та poly(dGC/dGC). До того ж спектри поглинання комплексів ССуан 40 з ДНК є значно більш схожими на спектри комплексів цього барвника з poly(dGC/dGC), ніж з poly(dA/dT).

Спектри флуоресценції ССуан 40. Спектри флуоресценції вільного та зв'язаного з НК барвника ССуан 40 наведено на рис. 4. Значення довжини хвилі максимуму спектра флуоресценції λ_f у присутності НК зсунуті на 5—9 нм у довгохвильовий бік порівняно з λ_f вільного барвника.

Квантовий вихід вільного ССуан 40 є порівняно високим ($\varphi = 0,042$). У присутності НК величина φ зростає, причому у випадку ДНК та poly(dGC/dGC) — у 5,5 та 3,8 разу, тоді як для poly(dA/dT) — лише в 1,8 разу. Цей факт ще раз підтверджує специфічність взаємодії ССуан 40 з НК різного нуклеотидного складу. При цьому спри-

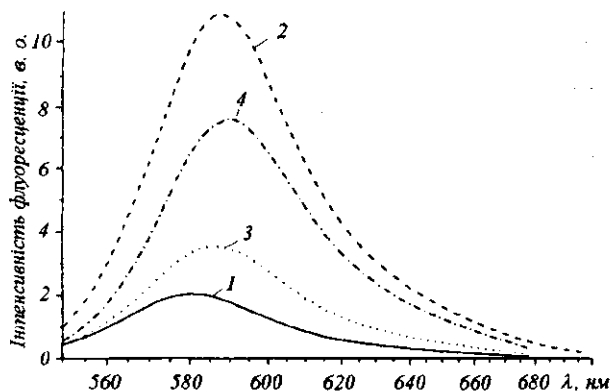


Рис. 4. Спектри флуоресценції барвника ССуап 40 (10^{-6} М) у вільному стані (1) та в присутності ДНК (2), $\text{poly}(dA/dT)$ (3) і $\text{poly}(dGC/dGC)$ (4) (концентрації НК рівні $6 \cdot 10^{-5}$ М п. о.). Інтенси́вність флуоресценції наведено у відносних одиницях (в. о.)

чинені додаванням НК зміна λ_n , λ_{abs} та гіпохромізм свідчать, що порівняно невелике збільшення φ не є наслідком посилення в'язкості розчину при додаванні НК, а викликане взаємодією ССуап 40 з НК. Слід зауважити, що хоча зростання φ при зв'язуванні з ДНК є незначним, за абсолютним значенням квантовий вихід ССуап 40 у присутності ДНК є вдвічі більшим, ніж φ зв'язаного з ДНК широкоживаного флуоресцентного зонда ТО [17].

Цікаво порівняти флуоресцентні характеристики ССуап 40 у різних розчинниках. Як видно з табл. 1, λ_n та φ вільного барвника в ДМФА, ДМСО та етанолі є близькими до відповідних величин барвника в присутності ДНК та значно відрізняються від λ_n та φ вільного барвника в буфері. Тому природно припустити, що підвищення інтенсивності флуоресценції ССуап 40 при зв'язуванні з НК є наслідком не лише жорсткої фіксації молекули барвника, а й значною мірою спричинене екрануванням її від водного оточення, тобто є сольватофлуорохромним ефектом.

Взаємодія ССуап 40 з ДНК, $\text{poly}(dGC/dGC)$ та $\text{poly}(dA/dT)$: вплив іонної сили. Як зазначалося вище, зсув λ_{abs} і λ_n та підвищення φ барвника в присутності НК суттєво залежать від нуклеотидного складу НК. Для вивчення взаємодії ССуап 40 з різними НК нами було досліджено вплив іонної сили на флуоресцентні властивості барвників у присутності ДНК (табл. 1).

З даних табл. 1 видно, що присутність 0,5 М NaCl практично не впливає на λ_n вільного барвника та незначно збільшує його φ . Для ССуап 40 у присутності ДНК та $\text{poly}(dGC/dGC)$ додавання солі призводить до короткохвильового зсуву λ_n (на 4 та 6 нм відповідно) та помітного (в 3—4 рази)

Таблиця 1

Квантовий вихід флуоресценції (φ) та довжина хвилі максимуму спектра флуоресценції (λ_n) карбоціанінового барвника ССуап 40 у вільному стані (в буфері, ДМФА, ДМСО чи етанолі) та в присутності ДНК, $\text{poly}(dGC/dGC)$ та $\text{poly}(dA/dT)$, а також вплив NaCl на ці параметри

ССуап 40	λ_n , нм	φ
Вільний барвник у ДМФА	589	0,18
Вільний барвник у ДМСО	591	0,23
Вільний барвник в етанолі	586	0,2
Вільний барвник у буфері	581	0,042
Вільний барвник у буфері + 0,5 М NaCl	581	0,045
Барвник + ДНК	588	0,23
Барвник + ДНК + 0,5 М NaCl	584	0,06
Барвник + $\text{poly}(dGC/dGC)$	590	0,16
Барвник + $\text{poly}(dGC/dGC)$ + 0,5 М NaCl	584	0,05
Барвник + $\text{poly}(dA/dT)$	586	0,076
Барвник + $\text{poly}(dA/dT)$ + 0,5 М NaCl	584	0,055

зниження φ . У той же час для ССуап 40 в присутності $\text{poly}(dA/dT)$ додавання солі знижує квантовий вихід лише в 1,4 разу, а зсув λ_n складає 2 нм. Отже, хоча квантовий вихід барвника в присутності $\text{poly}(dA/dT)$ є помітно нижим, ніж у присутності ДНК та $\text{poly}(dGC/dGC)$, проте його комплекс з $\text{poly}(dA/dT)$ є значно стійкішим до іонної сили, ніж комплекс з $\text{poly}(dGC/dGC)$ та з ДНК.

Таким чином, цілий ряд властивостей (зсув λ_{abs} , підвищення φ , стійкість до іонної сили) вказує на те, що комплекси ССуап 40 з ДНК та з $\text{poly}(dGC/dGC)$ утворені за одним механізмом, а з $\text{poly}(dA/dT)$ — за іншим. Відомо, що при взаємодії з GC-послідовностями не може реалізуватися борозенкова взаємодія [21]. З огляду на це можна висловити припущення, що комплекси ССуап 40 з ДНК та з $\text{poly}(dGC/dGC)$ мають інтеркаляційний характер.

У роботі [13] з'ясовано, що димери 1,1'-діетилтіадикарбоціанінового барвника DiSC₂(5) утворюються в малій борозенці $\text{poly}(dAT/dAT)$, але у випадку $\text{poly}(dA/dT)$ їх не спостерігали. Цей факт було пояснено відмінною від В-форми конформацією $\text{poly}(dA/dT)$. У роботі [22] наводяться відомості про можливість гомопуриново-гомопіримідинової послідовності длДНК та гомопіримідинового олігонуклеотиду утворювати стабільну потрійну спіраль. Таким чином, цілком можливо, що полінуклеотид $\text{poly}(dA/dT)$ існує насправді у ви-

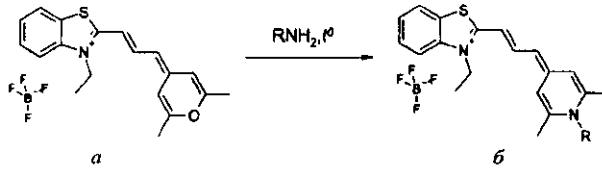


Рис. 5. Схема реакції мічення аміноалкілолігонуклеотиду (RNH₂) барвником ССуап 39. Останній при цьому перетворюється в ССуап 40

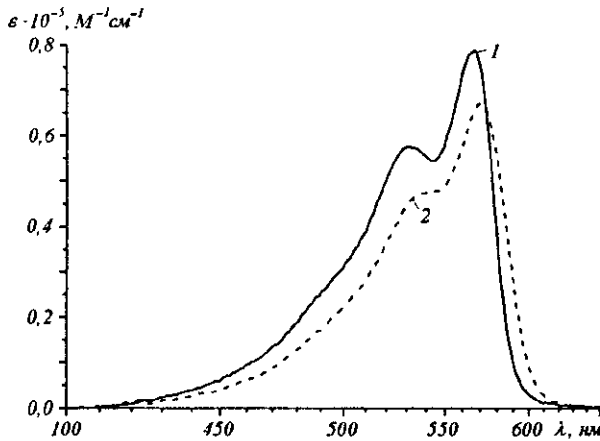


Рис. 6. Спектри поглинання барвника ССуап 39 у вільному стані та в присутності ДНК: 1 — 10⁻⁶ М ССуап 39; 2 — 10⁻⁶ М ССуап 39 + 6 · 10⁻⁵ М ДНК

гляді потрійної спіралі poly(dA/dT/dT). Найімовірнішою тут є реалізація інтеркаляційного механізму зв'язування ССуап 40. Слід припустити, що при інтеркаляції в poly(dA/dT/dT) молекула барвника є відкритішою для впливу середовища, ніж при інтеркаляції в ДНК та poly(dGC/dGC). Подібне припущення пояснює як менше зростання φ , так і більшу схильність до агрегації з вільними молекулами барвника при взаємодії з poly(dA/dT/dT) порівняно з ДНК та poly(dGC/dGC). Разом з тим підвищення іонної сили розчину стабілізує потрійну спіраль [22], що й пояснює більшу стійкість комплексів ССуап 40 з poly(dA/dT) до NaCl.

Спектральні властивості вихідного барвника ССуап 39. Барвник ССуап 39 використовується як нефлуоресцентний попередник барвника ССуап 40 у реакції ковалентного мічення олігонуклеотиду (рис. 5).

Нами було досліджено спектрально-люмінесцентні властивості ССуап 39. Максимум спектра поглинання вільного барвника ССуап 39 в буфері (рис. 6) знаходиться на 566 нм. Оскільки спектр поглинання не змінюється в інтервалі концент-

Таблиця 2
Квантовий вихід флуоресценції (φ) та довжина хвилі максимуму спектра флуоресценції (λ_{fl}) карбоціанінового барвника ССуап 39 у вільному стані та в присутності ДНК

ССуап 39	λ_{fl} , нм	φ
Вільний барвник у буфері	588	0,0019
Барвник + ДНК	601	0,047

рацій від 10⁻⁶ до 2 · 10⁻⁵ М, можна припустити, що при досліджених концентраціях у водному розчині ССуап 39 знаходиться головним чином у мономерній формі та не утворює агрегатів. У спектрах поглинання ССуап 39 за присутності ДНК (рис. 6) спостерігається довгохвильовий зсув максимуму λ_{abs} на ~4 нм.

Максимуми спектрів флуоресценції ССуап 39 у вільному стані та в присутності ДНК знаходяться при 588 та 601 нм відповідно. Вільний ССуап 39 у буфері має досить незначний квантовий вихід ($\varphi = 0,0019$), а в присутності ДНК φ зростає у 25 разів і сягає величини 0,047 (табл. 2).

Таким чином, квантовий вихід ССуап 39 є значно меншим, ніж для ССуап 40. Це означає, що незначні залишки вихідного барвника в реакційній суміші не впливатимуть на якість детекції НК «спалахуючим зондом», а відтак ці залишки не потребують виділення.

Перспективи застосування ССуап 40 для детекції НК. Як встановлено, барвник ССуап 40 має досить високі квантові виходи у вільному стані ($\varphi = 0,042$) та в присутності ДНК ($\varphi = 0,23$). Крім того, ССуап 40 має високий коефіцієнт екстинкції (близько 5 · 10⁴ М⁻¹ см⁻¹) та широку смугу поглинання (барвник можна ефективно збуджувати в інтервалі 450—580 нм) (рис. 3, а). При цьому смуга випромінювання барвника є досить вузькою (560—650 нм, напівширина становить 45 нм) (рис. 4). Отже, спектрально-люмінесцентні властивості ССуап 40 дозволяють використовувати його як флуорофор для створення «спалахуючого зонда».

Висловлено припущення, що комплекси некон'югованого ССуап 40 з ДНК, poly(dGC/dGC) та poly(dA/dT) мають інтеркаляційний характер. Проте в літературі є багато даних про борозенкову взаємодію карбоціанінових барвників [12, 13, 20]. Тому при гібридизації «спалахуючого зонда» з НК можлива реалізація борозенкового механізму зв'язування ССуап 40 з НК і, як наслідок, підвищення інтенсивності флуоресценції зонда.

S. M. Yarmoluk, M. Yu. Losytskyy, V. B. Koval'ska,
S. M. Tomachynski, T. Yu. Ogulchansky,
O. M. Kostenko, V. V. Kurdyukov, O. I. Tolmachev

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. New (pyrido)(thio)trimethincyanine dye CCyan 40 for fluorescent labeling of oligonucleotides

Summary

The spectral-luminescent characteristics of the CCyan 40 carbocyanine dye in free state and in the presence of DNA and synthetic polynucleotides were studied. The dye has high molar extinction coefficient ($5.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and average quantum yield value (0.042). In the presence of DNA, poly(dGC/dGC) and poly(dA/dT) the quantum yield of CCyan 40 increases in 5.5, 3.8 and 1.8 times respectively. We recommend the dye CCyan 40 for the fluorescent labeling of oligonucleotides using the reaction, proposed by us earlier.

С. Н. Ярмолук, М. Ю. Лосицкий, В. Б. Ковальская,
С. М. Томачинский, Т. Ю. Огульчанский,
А. Н. Костенко, В. В. Курдюков, О. И. Толмачев

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. Новый (пиридо)(тио)триметинцианиновый краситель ССуап 40 для флуоресцентного мечения олигонуклеотидов

Резюме

Исследованы спектрально-люминесцентные характеристики карбоцианинового красителя ССуап 40 в свободном состоянии и в присутствии ДНК и полинуклеотидов. Краситель имеет высокое значение молярного коэффициента экстинкции ($5,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и средний квантовый выход (0,042). В присутствии ДНК, poly(dGC/dGC) и poly(dA/dT) квантовый выход ССуап 40 возрастает в 5,5; 3,8 и 1,8 раза соответственно. ССуап 40 предлагается для флуоресцентного мечения олигонуклеотидов в условиях реакции, предложенной нами ранее.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Svanvik N., Westman G., Wang D., Kubista M. Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution // *Anal. Biochem.*—2000.—281.—P. 26—35.
- Fan Z. H., Mangru Sh., Granzow R., Heaney P., Ho W., Dong Q., Kumar R. Dynamic DNA hybridization on a chip using paramagnetic beads // *Anal. Chem.*—1999.—71.—P. 4851—4859.
- Whitcombe D., Newton C. R., Little S. Advances in approaches to DNA-based diagnostics // *Curr. Opin. Biotechnol.*—1998.—9.—P. 602—608.
- Selvin P. R. Fluorescence resonance energy transfer // *Meth. Enzymol.*—1995.—246.—P. 300—334.
- Ishiguro T., Saitoh J., Yawata H., Otsuka M., Inoue T., Sugiura Y. Fluorescence detection of nucleic acids by oxazole yellow-linked oligonucleotides. Homogeneous quantitative monitoring of *in vitro* transcription // *Nucl. Acids Res.*—1996.—24, N 24.—P. 4992—4997.
- Yarmoluk S. M., Koval'ska V. B., Smirnova T. V., Shandura M. P., Kovtun Yu. 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, № 6.—С. 74—81.
- Yarmoluk S. M., Kostenko O. M., Dubey I. Ya. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. Part 19: New method for the covalent labeling of oligonucleotides with pyrylium cyanine dyes // *Bioorg. and Med. Chem. Lett.*—2000.—10.—P. 2201—2204.
- Larsson A., Carlsson Ch., Jonsson M. Characterisation of the binding of YO to [poly(dA-dT)]₂ and [poly(dG-dC)]₂, and of the fluorescent properties of YO and YOYO complexed with the polynucleotides and double-stranded DNA // *Biopolymers.*—1995.—36.—P. 153—167.
- 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.
- Лукашов С. С., Лосицкий М. Ю., Ярмолук С. М., Сломінський Ю. Л. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 12. Нові монометинові ціаніни на основі 5,6-метилендіоксibenзотіазолу та спектрально-люмінесцентні властивості їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 6.—С. 562—572.
- Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—232 с.
- Mikheikin A. L., Zhuze A. L., Zasedatelev A. S. Binding of symmetrical cyanine dyes into the DNA minor groove // *J. Biomol. Struct. and Dynam.*—2000.—18, N 1.—P. 59—72.
- Seifert J. L., Connor R. E., Kushon S. A., Wang M., Armitage B. A. Spontaneous assembly of helical cyanine dye aggregates on DNA nanotemplates // *J. Amer. Chem. Soc.*—1999.—121.—P. 2987—2995.
- Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.—М.: Наука, 1989.—274 с.
- Kasha M. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates // *Rad. Res.*—1963.—20.—P. 55—71.
- Herz A. H. Dye-dye interactions of cyanines in solution and at AgBr surfaces // *Phot. Sci. and Eng.*—1974.—18, N 3.—P. 323—335.
- Nygren J., Svanvik N., Kubista M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA // *Biopolymers.*—1998.—46.—P. 39—51.
- Огульчанський Т. Ю., Яшук В. М., Ярмолук С. М., Лосицкий М. Ю. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 14. Спектральні особливості деяких монометинових бензотіазолових ціанінових барвників та їхньої взаємодії з ДНК // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 5.—С. 345—355.
- Wang M., Silva G. L., Armitage B. A. DNA-templated formation of a helical cyanine dye J-aggregate // *J. Amer. Chem. Soc.*—2000.—122.—P. 9977—9986.
- Ogulchansky T. Yu., Losytskyy M. Yu., Koval'ska V. B., Lukashov S. S., Yashchuk V. M., Yarmoluk S. M. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XVIII. Formation of the carbocyanine dye J-aggregates in nucleic acid grooves // *Spectrochim. acta. Part A.*—2001.—57, N 13.—P. 2705—2715.
- Kumar C. V., Turner R. S., Asuncion E. H. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect // *J. Photochem. and Photobiol. A: Chem.*—1993.—74.—P. 231—238.
- Helene C., Toulme J.-J. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids // *Biochim. et biophys. acta.*—1990.—1049.—P. 99—125.

УДК 535.372

Надійшла до редакції 09.04.01