

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 11. Синтез та спектральні властивості нових 2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-їл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридинієвих гомодимерних ціанінових барвників

І. О. Кочешев, В. Б. Ковальська, С. М. Ярмолук

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

Запропоновано новий зручний метод синтезу гомодимерів ціанінових барвників за допомогою реакції первинних амінів з пірилісними солями, що дозволяє отримувати гомодимери з різними за довжиною та хімічним складом лінкерами. Вивчено спектрально-люмінесцентні властивості синтезованих барвників та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами, а також залежність цих властивостей від довжини та хімічної природи лінкера. Синтезований барвник К6 у комплексі з ДНК продемонстрував підвищення інтенсивності флюоресценції приблизно у 1500 разів, та с, на нашу думку, перспективним як флюоресцентний зонд для детекції нуклеїнових кислот.

Вступ. У 1978 р. автори роботи [1], ковалентно з'єднавши сперміновим лінкером дві молекули бромистого етидію, синтезували гомодимер етидію (EtD; 5,5'-[4,7-діазодескаметилен]-біс[3,8-діаміно-6-фенілфенантридиніум]дихлорид). Спорідненість EtD до нуклеїнових кислот (НК) була у тисячу разів вищою порівняно з мономером. При зв'язуванні з двоспінальною (дс) ДНК квантовий вихід флюоресценції гомодимера в порівнянні з мономерним барвником збільшувався у сорок разів. EtD був з успіхом застосований для флюоресцентної детекції дсДНК, встановлення розмірів та кількісного визначення фрагментів рестрикції ДНК у гелі [3].

У 1992 році Раем та ін. [2], використавши ту ж саму методику, вперше синтезували два димерні ціанінові барвники ТОТО (1,1'-(4,4,7,7-тетраметил-4,7-діазоундескаметилен)-біс-4-[3-метил-2,3-дигідро-(бензо-1,3-тіазол)-2-метиліден]-хінодин тетраїодид) та YOYO (1,1'-(4,4,7,7-тетраметил-4,7-діазоундескаметилен)-біс-4-[3-метил-2,3-дигідро-(бензо-1,3-оксазол)-2-метиліден]-хінодин тетраїодид). Коефіцієнти молярної екстинкції та кон-

станти зв'язування з ДНК для димерів суттєво перевищували ті ж показники мономерів. Практично нефлюоресцентні у вільному стані димерні ціаніни збільшували інтенсивність випромінювання в комплексах з НК приблизно у 3000 разів.

Визначення НК з використанням гомодимерів асиметричних ціанінів за чутливістю практично зрівнялося з радіоізотопним методом та стало набагато чутливішим, ніж детекція за допомогою широкопоширеного EtD [1—4]. Ці барвники були успішно застосовані для детекції та визначення розмірів дсДНК в агарозному гелі [3], вивчення зв'язування дсДНК з білками [4]. За допомогою цих димерних ціанінів досліджували статичні та динамічні властивості ізольованих молекул ДНК [5] та міграції ДНК у рідинному капілярному електрофорезі [6].

Нещодавно нами було синтезовано нові бензтіазоло-4-[2,6-диметилпіридинієві] монометинові ціанінові барвники з перспективними спектральними властивостями для конструювання на їхній основі флюоресцентних зондів для детекції НК. Вищезазначені ціаніни синтезували за допомогою реакції 2-(2,6-диметил-піран-4-їліденметил)-3-ме-

тил-бензотіазолій перхлорату з первинними амінами [7].

Метою нашої роботи було отримання піридинієвих ціанінових гомодимерів за допомогою запропонованої раніше реакції [7]; вивчення їхніх спектральних властивостей та комплексів з НК. Було досліджено вплив довжини та хімічної природи лінкера на спектральні властивості комплексів гомодимерний барвник—НК.

Матеріали і методи. Диметилформаїд (ДМФА), етиловий спирт 95 %, бутанол-1, оцтова кислота («Реакім», Росія) були використані в роботі без попереднього очищення.

Етилендіамін, 1,3-діамінопропан, 1,4-діамінобутан, 1,5-діамінопентан, 1,6-діаміногексан, 1,5-діаміно-3-оксапентан, біс-(3-амінопропіл)амін, триетилентетраамін, трис(оксиметил)-амінометіан гідрохлорид (трис) були фірми «Aldrich» (США).

N,N'-біс-(6-аміногексанон)піперазин було синтезовано ацилюванням піперазину хлорангідридом 6-(1,3-діоксо-2,3-дигідро-1Н-2-ізоіндоліл)гексанової кислоти. До 1 моль піперазину, розчиненого в мінімумі абсолютного діоксану, додавали 2 моль піридину і 2 моль хлорангідриду 6-(1,3-діоксо-2,3-дигідро-1Н-2-ізоіндоліл)гексанової кислоти. Суміш доводили до кипіння і витримували протягом 10 хв. Продукт осаджували 10 % HCl і перекристалізували із спирту. 1,3-діоксо-2,3-дигідро-1Н-2-ізоіндолільний захист знімали за допомогою гідрозингідрату в спирті згідно з [8].

Хлорангідрид 6-(1,3-діоксо-2,3-дигідро-1Н-2-ізоіндоліл)гексанової кислоти отримували, як у роботі [8].

2-(2,6-диметил-піран-4-іліденметил)-3-метил-бензотіазолій перхлорат (Суап 39) та 4-[(1-метил-бензотіазоліліден-2)метил]-1,2,6-триметилпіридиніум перхлорат (Суап 40) були люб'язно надані С. С. Лукашовим.

Для дослідження властивостей комплексів НК з ціаніновими барвниками використовували ДНК з тимусу бика та тотальну дріжджову РНК («Sigma», США).

Для тонкошарової хроматографії використовували платівки «Silufol» (Чехія). Хроматографію здійснювали в системі бутанол/оцтова кислота/вода (4 : 2 : 2).

Спектроскопічні виміри. Спектри абсорбції отримано з використанням спектрофотометра Specord M-40 (ФРН) одразу ж після приготування розчинів барвників та їхніх комплексів з НК у відповідних розчинниках: водному буфері або ДМФА.

Для всіх спектроскопічних досліджень використано водний буфер (50 мМ трис-HCl, pH 7,5).

Спектри флюоресценції записували за допомо-

гою флюоресцентного спектрофотометра Hitachi Model 850 (Японія). Флюоресцентні виміри проводили в термостатованій кварцевій кюветі (1 × 1 см). Для збудження флюоресценції використовували випромінювання ксенонової лампи (150 Вт).

Спектри ЯМР ¹H отримували на приладі «Varian» — 300 МГц з внутрішнім стандартом ТМС.

Приготування стокових розчинів НК та барвників. Стокові розчини барвника Суап 40 з концентрацією 2,0 · 10⁻³ М та гомодимерних піридинієвих ціанінів з концентрацією 1,0 · 10⁻³ М отримували розчиненням барвників у ДМФА. Стокові розчини НК мали концентрацію: 6,1 · 10⁻³ М⁻¹ для ДНК і 1,2 · 10⁻² М⁻¹ для РНК.

Приготування робочих розчинів барвників та комплексів барвників з НК. Робочі розчини комплексів барвників з НК готували змішуванням стокових розчинів барвника та НК у буфері. Перед вимірюванням робочі розчини витримували в темному місці протягом 20 год [2].

Робоча концентрація для барвника Суап 40 дорівнювала 2,0 · 10⁻⁵ М, для гомодимерних піридинієвих ціанінів — 1,0 · 10⁻⁵ М. ДНК та РНК в робочому розчині мали концентрації 1,2 · 10⁻⁴ М та 2,4 · 10⁻⁴ М відповідно. Таким чином, співвідношення в комплексах барвник—нуклеїнова кислота для Суап 40 становили: одна молекула барвника на 12 основ для РНК і на 6 пар основ для ДНК. Для гомодимерних ціанінів це співвідношення складало: одна молекула барвника на 24 основи для РНК і на 12 пар основ для ДНК.

Титрування барвника К-6 нуклеїновими кислотами здійснювали в буфері при фіксованій концентрації барвника 1,0 · 10⁻⁵ М. Концентрації ДНК і РНК змінювали від 3,0 · 10⁻⁵ до 1,2 · 10⁻³ та від 6 · 10⁻⁵ до 9,6 · 10⁻⁴ М відповідно.

Синтез гомодимерів. Наважку барвника Суап 39 0,277 г (0,75 ммоль) розчиняли при нагріванні в 10—15 мл ДМФА і додавали 0,35 ммоль відповідного діаміну, попередньо розчиненого в невеликій кількості ДМФА (1—2 мл). Потім кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 1—2 год, після чого до гарячої реакційної суміші додавали 10—15 мл спирту і охолоджували до кімнатної температури.

Продукт випадав у вигляді осаду жовто-зеленого кольору. Осад фільтрували і перекристалізували із суміші ДМФА зі спиртом (1 : 2). Вихід від 40 до 60 % (табл. 1). Чистоту отриманого димера перевіряли за допомогою тонкошарової хроматографії. Структуру підтверджували за допомогою ЯМР-спектроскопії (табл. 1). Схему синтезу та хімічні структури піридинієвих ціанінових гомодимерів представлено на рис. 1.

Таблиця 1
Характеристики ПМР-спектрів синтезованих гомодимерів

№	Назва	Вихід ре-акції, %	Хімічні зсуви, σ					
			Наром	-CH-	NCH ₃	CH ₃	-N-CH ₂	-CH ₂ -
K1	2-{{1-(5-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}пентил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридинілден]-метил}-3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум дихлорат	55	7,83 (2) д 7,53 (4) кв 7,23 (6) м	6,03 (2) с	3,68 (6) с	2,70 (12) с	4,20 (4) уш т	1,80 (4) м 1,56 (2) с
K2	2-{{1-(6-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}гексил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридинілден]-метил}-3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум дихлорат	60	7,85 (2) д; 7,53 (4) кв; 7,23 (6) м	6,03 (2) с	3,68 (6) с	2,69 (12) с	4,18 (4) уш т	1,76 (4) м; 1,51 (4) с
K3	2-{{1-[2-(2-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}етокси)етил]-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридинілден]-метил}-3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум дихлорат	40	7,73 (2) д; 7,38 (2) м; 7,28 (2) м; 7,08 (6) м	5,94 (2) с	3,51 (6) с	2,56 (12) с	4,42 (4) уш т	3,83 (4) м
K4	N1-(3-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}пропіл)-3-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-1-пропанамін дихлорат	40	7,79 (2) уш д; 7,47 (4) уш м; 7,15 (6) уш м	5,96 (2) уш с	3,65 (6) уш с	2,67 (12) уш с	4,24 (4) уш т	2,50 (4) уш с; 1,88 (4) уш м
K5	N1,N2-ди(2-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}етил)-1,2-етандіамін дихлорат	45	7,84 (2) уш д; 7,54 (4) уш м; 7,16 (6) уш м	5,97 (2) уш с	3,65 (6) уш с	2,68 (12) уш с	4,25 (4) уш т	3,56 (8) уш м
K6	6-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-1[4-(6-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}гекса-ноіл)-піперазино]-1-гексанон дихлорат	65	7,86 (2) д; 7,53 (4) кв; 7,22 (6) м	6,02 (2) с	3,67 (6) с	2,68 (12) с	4,14 (4) уш т	3,47 (4) уш д; 2,37 (4) уш т; 1,74 (4) уш м; 1,59 (4) уш м; 1,42 (4) уш м

Примітка. При описанні спектрів ПМР використано скорочення: с — синглет, д — дублет, т — триплет, кв — квартет, м — мультіплет, уш — уширений пік. У дужках наведено кількість протонів.

Результати. Спектроскопічні дослідження. Спектрально-люмінесцентні характеристики барвників у ДМФА та буфері наведено в табл. 2.

Адсорбційні максимуми барвників K1—K6 (λ_{mol}) у малополярному ДМФА розташовані на

445—449 нм. При переході до полярного водного буфера адсорбційні максимуми незначно зсуваються в довгохвильовий бік на 5—13 нм. Досліджені гомодимерні барвники в буфері утворюють агрегати, про що свідчить поява додаткової короткох-

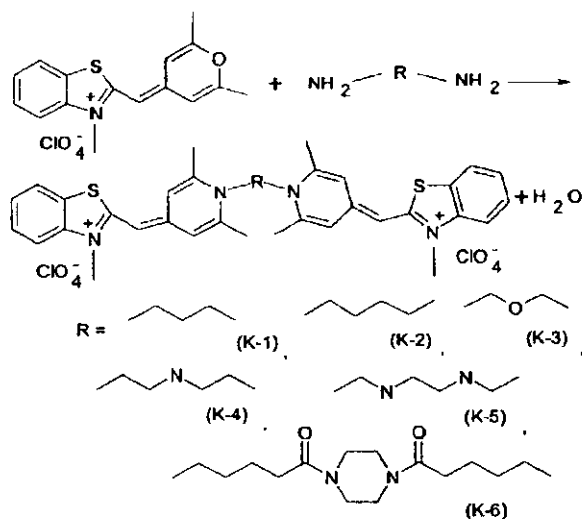


Рис. 1. Синтез гомодимерів за допомогою реакції 2-(2,6-диметил-піран-4-їліденметил)-3-метил-бензотіазолій перхлорату з первинними діамінами

вильової смуги (λ_{agr}), яка з'являється у спектрах адсорбції як вільних барвників, так і їхніх комплексів з НК на 408—430 нм. Інтенсивність додаткової смуги поглинання перевищує таку основної (молекулярної) смуги поглинання (D_{mol}/D_{agr} — відношення інтенсивностей основної та додаткової смуг поглинання) (табл. 3).

Для порівняння у дослідженнях використано ціаніновий барвник Суан 40. Його максимум поглинання в малополярному ДМФА розташований на 441 нм, а при переході до водного буфера зсувається в короткохвильовий бік на 5 нм.

Максимуми флюоресценції вільних піридинієвих гомодимерів (табл. 2) розташовані в інтервалі 520—585 нм (λ_0). Для Суан 40 цей максимум знаходиться на 475 нм. Стоксові зсуви (ΔS_0) барвників дорівнювали 45—131 нм. Усі робочі розчини досліджуваних барвників мали невелику власну флюоресценцію ($I_0 = 0,08—0,65$ відносних одиниць, в. о.).

Спектральні характеристики комплексів барвників з НК наведено в табл. 3, 4.

Смуги поглинання мономерної форми барвника для ціанінів K1—K6 у комплексах з ДНК та РНК розташовані на 452—464 нм (табл. 3).

При взаємодії з НК для гомодимерів інтенсивність агрегаційної смуги зменшується, а молекулярної — зростає. Для барвників K4 та K6 у комплексах з НК виявляється ще один максимум поглинання на 394 та 407 нм відповідно (ці піки вираженіші для комплексів з ДНК).

У спектрах поглинання комплексів Суан 40—НК максимуми знаходяться на 437 нм. Для Суан 40 агрегаційних смуг не спостерігається.

Максимуми випромінювання комплексів барвників з НК (табл. 4) знаходяться на 483—497 нм ($\lambda_{DNA}, \lambda_{RNA}$). Стоксові зсуви комплексів барвників з НК ($\Delta S_{DNA}, \Delta S_{RNA}$) лежать у межах 29—44 нм.

Інтенсивність флюоресценції (I_{DNA}, I_{RNA}) комплексів ціанінів з ДНК дорівнює 2—130 в. о.; з

Таблиця 2
Дані спектральних досліджень ціанінових гомодимерів

№	Абсорбція				Флюоресценція			
	У ДМФА		У буфері (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5)		У буфері (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5)			
	λ_{mol} , нм	λ_{agr} , нм	λ_{mol} , нм	D_{mol}/D_{agr}	λ_{ex} , нм	λ_0 , нм	I_0 , в. о.	ΔS_0 , нм
K1	448	425	452	0.34	455	555	0.08	103
K2	447	418	460	0.18	455	580	0.49	120
K3	428, 449	421	455	0.23	455	550	0.15	95
K4	446	430	455	0.47	455	545	0.17	115
K5	446	428	455	0.52	455	520	0.42	65
K6	445	408	454	0.41	455	585	0.65	131
Суан 40	441	—	436	—	435	475	0.33	39

РНК — 8—92 в. о. Величина збільшення інтенсивності флюоресценції (відношення інтенсивності випромінювання барвника в комплексі до інтенсивності випромінювання чистого барвника (I/I_0)) для комплексів гомодимерів К1—К6 знаходиться в межах 4—200 для ДНК та 51—459 для РНК. Для Суан 40 це збільшення дорівнює 81 та 148 відповідно.

Графіки титрування барвника К6 нуклеїновими кислотами наведено на рис. 2. За даними титрування, насичення інтенсивності флюоресцентного випромінювання комплексів К6—НК настає при співвідношенні: одна молекула барвника на 20 пар основ ДНК (а) та на 40 основ РНК (б).

Обговорення. До цього часу димери ціанінових барвників синтезували тільки одним методом [2, 9, 12], а саме: алкілуванням N,N,N',N''-тетраметилдіаміноалкіла йодалкільними похідними ціанінових барвників (рис. 3). Реакцію проводили протягом 3 діб при температурі 90 °С і залишали ще на одну добу при 0 °С. При цьому отримували гомодимер з лінкером довжиною 10—16 вуглецевих атомів з двома позитивно зарядженими четвертинними атомами азоту в ланцюгу.

Нами було запропоновано новий підхід до синтезу ціанінових гомодимерів на основі реакції пірилієвих солей з первинними амінами [7]. Вихідною речовиною нам слугував 2-(2,6-диметил-піран-4-ілденметил)-3-метил-бензотіазолій перхлорат (Суан 39). Для отримання нових гомодимерних структур використовували різні за довжиною та хімічною природою діаміни (рис. 1).

Синтез у запропонованих нами умовах відбувається за 1—2 год. Умови проведення реакції досить прості, а виходи досить високі. За допомо-

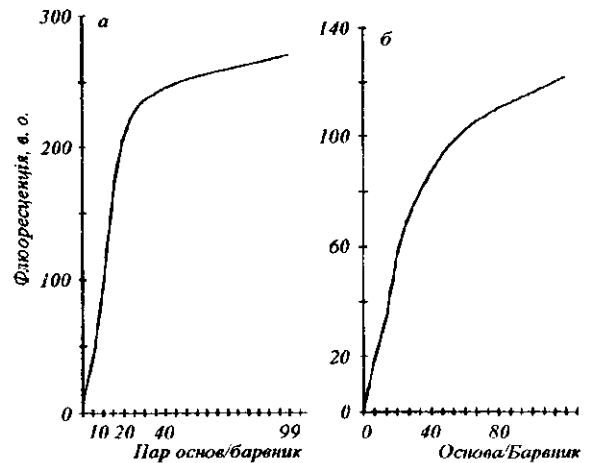


Рис. 2. Графіки титрування барвника К-6 нуклеїновими кислотами: ДНК (а) та РНК (б)

гою доступних реактивів можна отримати ціанінові гомодимери з лінкером довжиною 14—22 атоми.

У роботах [11, 12] для барвника ТОТО показано, що для утворення високофлюоресцентних комплексів з дсДНК потрібен лінкер довжиною не менше 12 атомів. У нашій роботі, крім синтезу барвника, що задовольняє цим вимогам (К6), досліджено можливість синтезу гомодимерів з коротшими лінкерами (К1—К5).

Спроби отримати гомодимери з лінкером, що містить у собі менше п'яти атомів, не привели до успіху. В реакціях етилендіаміну, 1,3-діамінопро-

Таблиця 3
Характеристики спектрів поглинання ціанінових гомодимерів у присутності НК

№	ДНК				РНК			
	λ , нм	λ_{agr} , нм	λ_{mol} , нм	D_{mol}/D_{agr}	λ , нм	λ_{agr} , нм	λ_{mol} , нм	D_{mol}/D_{agr}
К1	—	426	456	0,63	—	432	455	0,85
К2	—	421	452	0,46	—	422	457	0,47
К3	—	420	456	0,28	—	424	460	0,38
К4	394	427	464	0,66	400	435	446	1,00
К5	—	424	460	0,54	—	436	458	0,86
К6	407	424	455	0,78	—	427	452	0,92
Суан 40	—	—	437	—	—	—	437	—

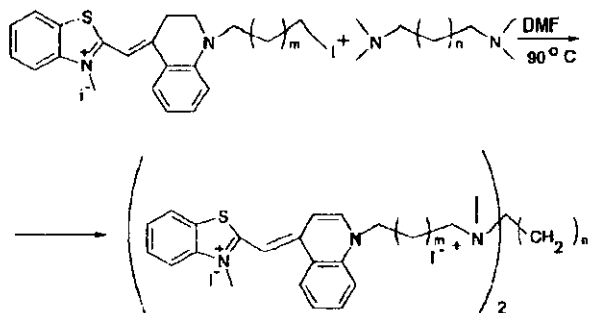


Рис. 3. Синтез гомодимеру ТОТО; $m = 1-2$; $n = 1-3$

пану та 1,4-діамінобутану з 10-кратним надлишком Суап 39 було отримано монопохідні (даних не наведено). На нашу думку, такі результати можна пояснити виникненням просторових ускладнень на стадії утворення димера з мономера.

Первинні діаміни, між аміногрупами яких знаходиться більше п'яти атомів, реагують з пірилієвим ядром Суап 39 з утворенням піридинієвих ціанінових гомодимерів навіть при надлишку діаміну.

Згідно з результатами спектроскопічних досліджень, синтезовані гомодимери мають високу здатність до утворення агрегатів у водних розчинах, що проявляється в появі інтенсивної додаткової короткохвильової смуги (408—430 нм) у спектрах поглинання (табл. 2). Для мономерного барвника Суап 40 такої смуги не спостерігається. Максимуми випромінювання вільних гомодимерів у порівнянні з мономерним Суап 40 значно зсува-

ються в довгохвильову область (на 50—100 нм) (табл. 2).

Максимуми поглинання для гомодимерних барвників у комплексах з НК (окрім барвника К-2) порівняно з максимумами вільних барвників розсуваються: агрегаційна смуга в спектрі поглинання зміщується в короткохвильову, а молекулярна — в довгохвильову області відповідно. Флюоресцентні максимуми гомодимерних ціанінів у комплексах з НК зсунуті в червону ділянку спектра відносно відповідних максимумів Суап 40 (табл. 3, 4).

Зміни спектроскопічних властивостей синтезованих гомодимерів порівняно з мономером є подібними до аналогічних змін, описаних для широкоживаних ТОТО та YOYO [2].

Для гомодимерів з коротким лінкером (К1—К5) у комплексах з дсДНК інтенсивність флюоресценції є набагато нижчою, ніж для мономерного ціанінового барвника Суап 40.

На нашу думку, короткі лінкери барвників К1—К5 не дозволяють утворювати високофлюоресцентні комплекси з дсДНК. Згідно з бісінтеркаляційним механізмом взаємодії, лінкери гомодимерів довжиною менше за 12 атомів не дають змоги утворювати високофлюоресцентні комплекси з дсДНК [11, 12]. На відміну від дсДНК для РНК значне підвищення інтенсивності флюоресценції досягається при довжині лінкера п'ять атомів. Це узгоджується з моделлю «взаємодії, подібної до часткової інтеркаляції» ТОТО в односпіральну (ос) ДНК, що запропонована Глазером. За цієї моделлю, внесок в утворення комплексу ТОТО—осДНК роблять стекінгова взаємодія між головними групами ТО з основами біополімера та кулонівська взаємодія між позитивними зарядами барвника та негативними зарядами на осДНК [9].

Таблиця 4

Характеристики спектрів флюоресценції ціанінових гомодимерів у присутності НК

№	λ_{DNA} , нм	I_{DNA} , в. о.	I_{DNA}/I_0	$\Delta\lambda_{DNA}$, нм	λ_{RNA} , нм	I_{RNA} , в. о.	I_{RNA}/I_0	$\Delta\lambda_{RNA}$, нм
K1	490	5,0	62,50	34	485	28,8	360,00	30
K2	485	1,8	3,67	33	484	27,8	56,73	27
K3	497	8,2	54,47	42	495	7,6	50,67	35
K4	493	14,0	82,35	29	490	78,0	458,80	44
K5	496	8,5	20,24	36	495	92,2	219,50	37
K6	484	130,0	200,00	29	487	65,6	100,90	35
Суап 40	480	26,8	81,21	43	483	57,7	147,85	46

Стосовно впливу хімічної природи лінкера на властивості комплексів барвників K1—K5 з РНК ми встановили, що короткий аліфатичний лінкер знижує флуоресцентну інтенсивність комплексів гомодимер—НК у порівнянні з Суап 40. Поява аміногрупи в лінкері з тією ж самою довжиною підвищує інтенсивність випромінювання комплексів з РНК. Недостатня для бісінтеркаляції довжина лінкерів барвників K1—K5 не дозволила проаналізувати вплив хімічної природи лінкера на властивості їхніх комплексів з дсДНК.

Для барвника K6, довжина лінкера якого достатня для бісінтеркаляції в дсДНК, інтенсивність випромінювання комплексів з дсДНК є вищою, ніж для РНК, та значно переважає таку мономерного Суап 40 з НК. Оскільки різниця між положеннями максимумів власної флуоресценції та флуоресценції комплексів з НК для K6 становить приблизно 100 нм, то на довжині хвилі флуоресценції комплексу барвник—НК спостерігається підвищення інтенсивності випромінювання приблизно у 2000 раз. На нашу думку, цей ціаніновий піридинний гомодимер є дуже перспективний як флуоресцентний зонд для детекції ДНК.

И. А. Кочешев, В. Б. Ковальская, С. Н. Ярмолюк

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 11. Синтез и спектральные свойства новых 2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензтиазол-3-ил-2-ил)метиле]-1,4-дигидро-1-пиридиниевых гомодимерных цианиновых красителей

Резюме

57

Предложен новый удобный метод синтеза гомодимеров цианиновых красителей с помощью реакции первичных аминов с пирролиевыми солями. Метод позволяет получать гомодимеры с различными по длине и химическому составу линкерами. Изучены спектрально-люминесцентные свойства синтезированных красителей и их комплексов с НК, а также зависимость этих свойств от длины и химической природы линкера. Синтезированный нами краситель K6 в комплексе с ДНК продемонстрировал увеличение интенсивности флуоресценции приблизительно в 2000 раз и, по нашему мнению, является перспективным для использования в качестве зонда для детекции нуклеиновых кислот.

I. A. Kocheshev, V. B. Kovalska, S. M. Yarmoluk

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 11. Synthesis and spectral properties of novel 2,6-dimethyl-4-[(3-methyl-1,3-benzothiazol-3-yl-2-yl)methylene]-1,4-dihydro-1-pyridinium homodimer cyanine dyes

Summary

A novel convenient method for cyanine homodimer dyes synthesis based on the reaction of primary amines with pyrrolium salts is

proposed. The method allows to obtain homodimers with linkers of different length and chemical nature. Spectral-luminescent properties of the dyes synthesized and their complexes with nucleic acids, as well as a dependence of these properties on the length and nature of linker were studied. A novel homodimer K6 in complexes with DNA showed approximately 2000-fold increase in fluorescence intensity. We consider this dye to be perspective as a fluorescent probe for the nucleic acids detection.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gaugain B., Barbet J., Oberlin R., Roques B. P., Le Peeg J.-B. DNA bifunctional intercalators. 1. Synthesis and conformational properties of an Ethidium homodimer and of an Acridine Ethidium heterodimer // *Biochemistry*.—1978.—24, N 17.—P. 5071—5078.
2. 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.
3. Rye H. S., Quesada M. A., Peck K., Glazer A. N. High-sensitive two-colour detection of double-stranded DNA with confocal fluorescent gel scanner using ethidium homodimer and thiazole orange // *Nucl. Acids Res.*—1990.—19.—P. 372—333.
4. Rye H. S., Drees B. L., Nelson H. C., Glazer A. Stable fluorescent dye-DNA complexes in high sensitivity detection of protein-DNA interaction // *J. Biol. Chem.*—1993.—268.—P. 25229—25238.
5. Goodwin P., Johnson M., Martin J. Rapid sizing of individual fluorescently staining fragments by flow cytometry // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21.—P. 803—806.
6. Carlsson C., Larsson A., Johnson M., Norden B. Dancing DNA in capillary solution electrophoresis // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—117.—P. 3871—3872.
7. Криворотенко Д. В., Ковальська В. Б., Ярмолюк С. М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 10. Синтез та спектральні властивості нових бензтіазоло-4-[2,6-диметилпіридинієвих] монометинових ціанінових барвників // *Біополімери і клітина*.—1999.—15 (Друкується).
8. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов.—Москва: Мир, 1965.—465 с.
9. Brooker L. G. S., Keyes G. H., Williams W. W. Color and constitution. V. The absorption of unsymmetrical cyanines. resonance as a basis for a classification of dyes // *J. Amer. Chem. Soc.*—1942.—64.—P. 199—210.
10. Rye H. S., Glazer A. N. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23.—P. 1215—1222.
11. Spielmann H., Wemmer D., Jacobsen P. Solution structure of DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy // *Biochemistry*.—1995.—34—P. 8542—8553.
12. Staek D., Hamed A. A., Pedersen E., Jacobsen J. P. Bisintercalation of homodimeric thiazole orange dyes in DNA: Effect of modifying the linker // *Bioconjugate Chem.*—1997.—8.—P. 869—877.

УДК 342.95

Надійшла до редакції 01.10.98