

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 15. Спектрально-люмінесцентні властивості нових бензотіазолметилен-2,6-диметилпіридинієвих гомодимерних та гомотримерних ціанінових барвників та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами

І. О. Кочешев, В. Б. Ковальська, С. М. Ярмолюк, Б. Акерман¹, Г. Х. Мацука

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

¹ Відділ фізичної хімії Чалмерського Технологічного університету
Гетеборг S-41296, Швеція

Вивчено спектрально-люмінесцентні властивості нових гомоди- та гомотримерних ціанінових барвників у вільному стані та в присутності нуклеїнових кислот (НК). Досліджені ціаніни продемонстрували підвищення інтенсивності випромінювання приблизно в 1200 разів у комплексах з ДНК та в 800 разів у комплексах з РНК, що робить їх перспективними для використання як флуоресцентних зондів при детекції НК. Висунуто припущення щодо характеру і природи агрегатів вільних барвників та їхніх комплексів з НК. На основі отриманих даних запропоновано можливі структури агрегатних комплексів барвників у вільному стані та в присутності НК.

Вступ. Широковживані в лабораторній практиці для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот (НК) бромистий етидій та ціанінові барвники, як правило, утворюють інтеркаляційні комплекси з НК [1–3]. Загальновідомо, що використання *n*-мерних поліінтеркаляторів значно підвищує стабільність та квантовий вихід утворених флуоресцентних комплексів з НК [4]. Найкраще вивченими з синтезованих бісінтеркалюючих ціанінів є гомодимерні барвники 1,1'-(4,4,7,7-тетраметил-4,7-діазоундекаметилен)-біс-4-[3-метил-2,3-дигідро-(бензо[1,3-тіазол]-2-метиліден)-хінолін тетраїодид (ТОТО) та 1,1'-(4,4,7,7-тетраметил-4,7-діазоундекаметилен)-біс-4-[3-метил-2,3-дигідро-(бензо[1,3-оксазол]-2-метиліден)-хінолін тетраїодид (УО-УО)]. Більш ніж 1000-разове підвищення квантово-

го виходу флуоресценції при взаємодії з НК, практично відсутня флуоресценція у вільному стані та високі коефіцієнти зв'язування з НК зробили ці гомодимери широкоживаними флуоресцентними зондами при визначенні НК [5–8].

У попередніх роботах ми запропонували принципово нові підходи до синтезу *n*-мерних ціанінових барвників. Зокрема, нами було синтезовано ряд нових ціанінових гомодимерних барвників на основі 2-(2,6-диметилпіран-4-іліденметил)-3-метил-бензотіазолій перхлорату. Димерний ціанін з синтезованого ряду 6-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-1-[4-(6-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридиніл}гексанойл)-піперазино]-1-гексанон диперхлорат (К-6) виявив перспективні властивості для використання його як флуоресцентного зонду для детекції нуклеїнових кислот [9].

Нами також було вперше синтезовано гомотримерний ціаніновий барвник 2-[1-(5-ди{5-[2,6-диметил-4-(3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум-2-ілметил-ен)-1,4-дигідро-1-піридиніл]пентилкарбоксамідо-пропіл}карбамоїлпентил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум (К-Т) [10].

Ціанінові барвники, як правило, утворюють агрегати у водних розчинах як у вільному стані, так і в присутності НК [2, 3, 11—13]. Гомодимерні ціаніни мають підвищену здатність до утворення агрегатних структур порівняно з мономерними барвниками, що відзначено в низці робіт [14]. Вплив агрегації на флюоресцентні властивості комплексів з НК практично не вивчався.

Метою даної роботи було дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей нових гомодимерних та гомотримерних ціанінових барвників та їхніх комплексів з НК, оцінка зазначених вище барвників як можливих флюоресцентних зондів для детекції НК. Окрім того, проведено ряд додаткових досліджень для вивчення характеру і природи взаємодії ціанінових барвників з НК та агрегатів барвників у вільному стані та в присутності НК. На основі отриманих даних нами було запропоновано можливу структуру агрегатних комплексів.

Матеріали і методи. *Матеріали.* Диметилформамід (ДМФА), етиловий спирт 95 %, бутанол-1, оцтова кислота, трис(оксиметил)-амінометан гідроклорид (трис) («Реахім», Україна) були використані в роботі без попереднього очищення. 2-(2,6-диметил-піран-4-ілденметил)-3-метил-бензотіазолій перхлорат (Суап 39) та 4-[(1-метилбензотіазоліліден-2)метил]-1,2,6-триметилпіридиніум перхлорат (Суап 40) були люб'язно надані С. С. Лукашовим.

Барвник К-6 був синтезований із Суап 39 згідно з [9].

Барвники К-7 (2-1-[5-(6-{5-[2,6-диметил-4-(3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум-2-ілметил-ен)-1,4-дигідро-1-піридиніл]пентилкарбоксамідо}гексилкарбамоїл)пентил]-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил-3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум) та К-Т були синтезовані, як описано в [10]. Структурні формули досліджених барвників представлено на рис. 1.

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

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

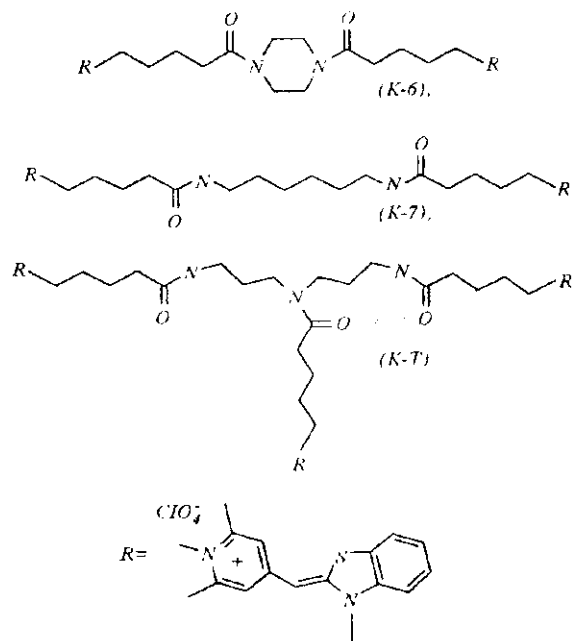


Рис. 1. Структурні формули ціанінових гомодимерних та гомотримерних барвників

Спектроскопічні виміри. Для всіх спектроскопічних досліджень застосовували водний буфер (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5).

Спектри поглинання отримано на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина) одразу ж після приготування розчинів барвників змішуванням їх з НК у відповідних розчинниках: водному буфері або ДМФА.

Спектри флюоресценції записували за допомогою спектрофлюориметра Hitachi Model 850 (Японія). Флюоресцентні виміри проводили в стандартній термостатованій кварцевій кюветі (0,5 × 0,5 см).

Спектри ¹H ЯМР отримували на приладі «Varian», 300 МГц (США) з внутрішнім стандартом ТМС.

Спектри лінійного дихроїзму (LD) реєстрували за допомогою спектрофотометра CARY 2300 (США), обладнаного поляризатором Глана.

Спектри лінійного дихроїзму та зведеного лінійного дихроїзму (LDr) були отримані та розраховані відповідно до [15].

Приготування стокових розчинів нуклеїнових

кислот та барвників. Стокові розчини барвників К-6, К-7 з концентрацією $1,0 \cdot 10^{-3}$ М, ціаніну К-Т з концентрацією $0,67 \cdot 10^{-3}$ М та барвника Суап 40 з концентрацією $2,0 \cdot 10^{-3}$ М отримували розчиненням барвників у ДМФА. Стокові розчини НК мали концентрацію $6,1 \cdot 10^{-3}$ М⁻¹ для ДНК і $1,2 \cdot 10^{-2}$ М⁻¹ для РНК.

Приготування робочих розчинів барвників та комплексів барвників з нуклеїновими кислотами. Робочі розчини барвників готували розведенням стокових розчинів барвників у буфері. Робочі концентрації для гомодимерних піридинієвих ціанінів були $1,0 \cdot 10^{-5}$ М, для тримерного барвника К-Т — $0,67 \cdot 10^{-5}$ М, для барвника Суап 40 — $2,0 \cdot 10^{-5}$ М.

Робочі розчини комплексів барвників з нуклеїновими кислотами готували, змішуючи стокові розчини барвника та НК у буфері. Перед вимірюванням робочі розчини витримували в темряві протягом 5 хв, 1 год та 20 год.

ДНК та РНК у робочому розчині мали концентрації $1,2 \cdot 10^{-4}$ та $2,4 \cdot 10^{-4}$ М відповідно. Таким чином, співвідношення в комплексах барвник—нуклеїнова кислота для К-6, К-7 становили: одна молекула барвника на 24 основи для РНК і на 12 пар основ для ДНК. Для ціаніну К-Т це співвідношення дорівнювало одна молекула барвника на 36 основ для РНК і на 18 пар основ для ДНК.

Барвники титрували нуклеїновими кислотами в буфері при фіксованій концентрації барвників: для К-6, К-7 — $1,0 \cdot 10^{-5}$, для К-Т — $0,67 \cdot 10^{-5}$ М. Концентрації ДНК і РНК змінювалися від $3,0 \cdot 10^{-5}$ до $1,2 \cdot 10^{-3}$ М та від $6 \cdot 10^{-5}$ до $9,6 \cdot 10^{-4}$ М відповідно. Спектри лінійного дихроїзму отримували при співвідношенні: для мономера Суап 40 — 1 барвник на 12 пар основ, для димеру К-6 — 1 барвник на 24 пари основ та для тримеру К-Т 1 барвник на 36 пар основ. Такий вибір концентрацій був спричинений необхідністю зменшення агрегаційних ефектів, що існують при утворенні комплексів барвник — двоспіральна (дс) ДНК.

Результати та обговорення. Спектри поглинання барвників та їхніх комплексів з НК. Спектри поглинання розчинів гомоди- та гомотримерних барвників у ДМФА та водному буфері представлені на рис. 2 та в табл. 1. Максимуми смуг поглинання барвників (λ_{mol}) у малополярному ДМФА розташовані на 445 нм. При переході до полярного водного буфера спостерігається їхній зсув у довгохвильовий бік на 7—15 нм. Досліджені барвники К-Т та К-6 у полярному буфері утворюють агрегати [11—13], про що свідчить поява в спектрах поглинання додаткової короткохвильової смуги (agr1) на 407—408 нм (λ_{agr1}). У спектрі К-7 спостерігаються дві додаткові смуги (agr1, agr2), розташовані на 405 та

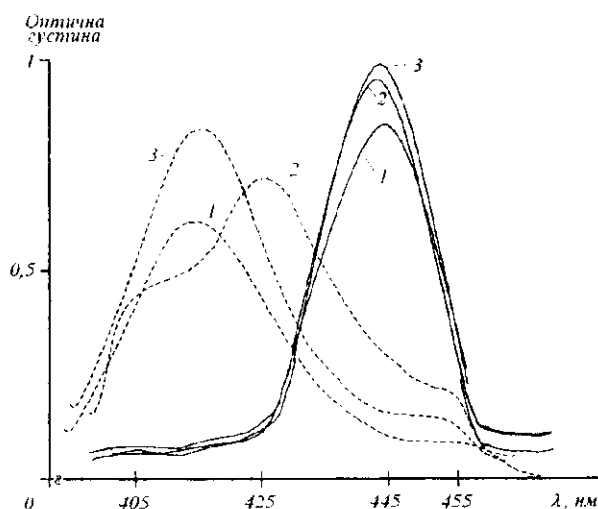


Рис. 2. Спектри поглинання гомоди- та гомотримерних ціанінових барвників в ДМФА (суцільна лінія) та водному буфері (пунктирна лінія): 1 — К-Т; 2 — К-7; 3 — К-6

424 нм (λ_{agr1} , λ_{agr2}), що може бути пояснено утворенням двох структурно різних Н-агрегатів (табл. 1, рис. 2).

Інтенсивність агрегатної смуги поглинання для розчинів барвників досліджених концентрацій в буфері перевищує інтенсивність молекулярної смуги поглинання ($D_{\text{mol}}/D_{\text{agr}}$ — відношення оптичних густин молекулярної та агрегатної смуг поглинання) (табл. 1, рис. 2).

Характеристики спектрів поглинання розчинів барвників К-6 та К-7 у присутності ДНК, які записували після 5 хв витримки суміші розчинів барвника та НК, представлені в табл. 2, 3 та на рис. 3. У цих спектрах розрізняються дві смуги з максимумами на 404—407 та 424—432 нм, що відповідають агрегатним смугам agr1 та agr2. У спектрах К-Т з ДНК чітко відрізняється лише одна смуга з максимумом на 410 нм, що відповідає агрегатній смугі agr1 (рис. 3). Утворення комплексів барвник—ДНК практично не впливає на розташування максимумів смуг молекулярного поглинання ціанінів, але спричиняє зростання їхніх інтенсивностей. Інтенсивність агрегатних смуг зменшується.

Після витримки комплексів барвник—ДНК протягом 1 год спостерігається зростання співвідношення $D_{\text{mol}}/D_{\text{agr}}$ (табл. 2, 3).

Для комплексів барвників К-6 та К-7 з РНК після витримки протягом 5 хв у спектрах погли-

Таблиця 1
Характеристики спектрів поглинання вільних ціанінових барвників

Барвник	ДМФА, λ_{mol} , нм	Буфер			
		λ_{agr1} , нм	λ_{agr2} , нм	λ_{mol} , нм	$D_{\text{mol}}/D_{\text{agr}}$
К-Т	445	407	—	460	0,204
К-7	445	405	425	452	0,71; 0,5
К-6	445	408	—	454	0,415

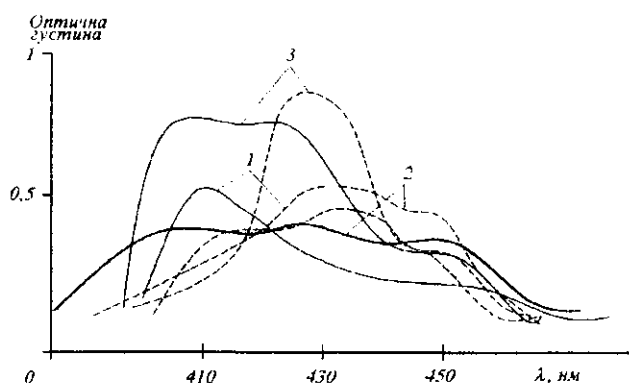


Рис. 3. Спектри поглинання розчинів гомоди- та гомотримерних ціанінових барвників в присутності ДНК (суцільна лінія) та РНК (пунктирна лінія): 1 — К-Т; 2 — К-7; 3 — К-6

нання чітко вирізняється тільки агрегатна смуга agr2 ($\lambda_{\text{max}} = 427$ нм) (табл. 2, рис. 3). У спектрах поглинання К-Т у присутності РНК після 5 хв витримки присутні дві агрегатні смуги agr1 та agr2 з максимумами на 414 та 428 нм відповідно, але після витримки протягом 1 год смуга agr1 (414 нм) зникає. Як і для комплексів з ДНК, у цьому випадку розташування смуг молекулярного поглинання барвників практично не змінюється, а їхня інтенсивність зростає в порівнянні з інтенсивністю поглинання комплексів одразу ж після приготування та після витримки протягом 5 хв (табл. 2, 3).

Спектри випромінювання розчинів вільних барвників та в присутності НК. Інтенсивність флюоресценції розчинів вільних барвників досліджували концентрацій в ДМФА (I_0) є відносно незначною (0,572—0,608 відносних одиниць (в. о.)), максимуми розташовані біля 487—490 нм, стоксові зсуви дорівнюють 42—45 нм (табл. 4).

Максимуми випромінювання розчинів вільних барвників у буфері при збудженні на довжині хвилі максимуму молекулярного поглинання барвників (табл. 4) розташовані в інтервалі 570—585 нм (λ_0), інтенсивність випромінювання становить 0,343—0,395 в. о. Досліджувані ціаніни мають великі стоксові зсуви (S_0) — 110—131 нм.

Максимуми випромінювання розчинів барвників з НК при збудженні на довжині хвилі максимуму молекулярного поглинання барвників (табл. 5) знаходяться біля 480—487 нм ($\lambda_{\text{DNA}}, \lambda_{\text{RNA}}$). Стоксові зсуви комплексів барвників з нуклеїновими кислотами ($S_{\text{DNA}}, S_{\text{RNA}}$) лежать у межах 20—35 нм. Інтенсивність флюоресценції ($I_{\text{DNA}}, I_{\text{RNA}}$) розчинів ціанінів з ДНК становить 47—79, з РНК — 28—52 в. о. Відношення інтенсивності випромінювання розчинів барвників у присутності НК на довжині хвилі максимуму випромінювання комплексу до інтенсивності випромінювання розчину вільного барвника на довжині хвилі максимуму випромінювання чистого барвника (I/I_0) для К-Т, К-6, К-7 лежать у межах 131—230 для ДНК та 78—152 для РНК.

Положення максимумів флюоресценції та інтенсивність випромінювання розчинів ціанінів з НК після 20-год витримки практично не змінюється (табл. 6).

Різниця між максимумами випромінювання вільних ціанінів та в присутності НК становить майже 100 нм. На довжині хвилі флюоресценції комплексів барвник—НК (480—487 нм) флюоресценція розчинів вільних барвників практично зрівнюється з фоном. Таким чином, для досліджуваних ціанінів реальне підвищення випромінювання становить 950—1200 разів для ДНК та 500—800 разів для РНК.

Флюоресцентне титрування ціанінових барвників нуклеїновими кислотами. Криві титрування барвників НК наведено на рис. 4. За даними титрування, насичення інтенсивності флюоресцен-

Таблиця 2

Характеристики спектрів поглинання комплексів ціанінових барвників з ДНК та РНК, зареєстрованих після витримки протягом 5 хв

Барвник	з ДНК				з РНК			
	λ_{agr1} , нм	λ_{agr2} , нм	λ_{mol} , нм	D_{mol}/D_{agr}	λ_{agr1} , нм	λ_{agr2} , нм	λ_{mol} , нм	D_{mol}/D_{agr}
К-Т	410	—	460	0,265	414	428	455	0,828; 0,800
К-7	404	432	454	0,800; 0,828	—	427	452	0,846
К-6	407	424	455	0,781	—	427	452	0,921

Таблиця 3

Характеристики спектрів поглинання комплексів ціанінових барвників з ДНК та РНК, зареєстрованих після витримки протягом 1 год

Барвник	з ДНК				з РНК			
	λ_{agr1} , нм	λ_{agr2} , нм	λ_{mol} , нм	D_{mol}/D_{agr}	λ_{agr1} , нм	λ_{agr2} , нм	λ_{mol} , нм	D_{mol}/D_{agr}
К-Т	410	—	458	0,375	—	429	453	0,778
К-7	405	433	449	1,3; 1	—	426	452	0,889
К-6	406	425	457	0,96	—	422	451	0,813

Таблиця 4

Характеристики спектрів випромінювання вільних ціанінових барвників

Барвник	λ_0 ДМФА, нм	I_0 ДМФА, в. о.	λ_0 буфер, нм	I_0 буфер, в. о.	S_0 ДМФА, нм	S_0 буфер, нм
К-Т	489	0,572	570	0,361	44	110
К-7	487	0,598	570	0,395	42	118
К-6	490	0,608	585	0,343	45	131

Таблиця 5

Характеристики спектрів випромінювання розчинів ціанінових барвників у присутності ДНК та РНК

Барвник	λ_{DNA} , нм	I_{DNA} , в. о.	I_{DNA}/I_0	S_{DNA} , нм	λ_{RNA} , нм	I_{RNA} , в. о.	I_{RNA}/I_0	S_{RNA} , нм
К-Т	480	47,3	131	20	485	28,1	78	30
К-7	483	83,6	212	29	483	50,3	127	31
К-6	484	78,7	230	29	487	52,0	152	35

Таблиця 6

Характеристики спектрів випромінювання розчинів ціанінових барвників у присутності ДНК та РНК після витримки протягом 20 год

Барвник	λ_{ex} , нм	ДНК, нм	/DNA, в. о.	/DNA/I ₀	РНК, нм	/RNA, в. о.	/RNA/I ₀
К-Т	455	480	46,8	130	483	28,4	79
К-7	455	480	80,4	204	483	30,1	76
К-6	455	483	101,4	296	485	43,0	125

Таблиця 7

Характеристики спектрів випромінювання розчинів ціанінових барвників у ДМФА при збудженні $\lambda_{ex} = 455$

Барвник	I_{em} , в. о.	λ_{em} , нм
К-Т	0,538	490
К-7	0,572	487
К-6	0,608	488

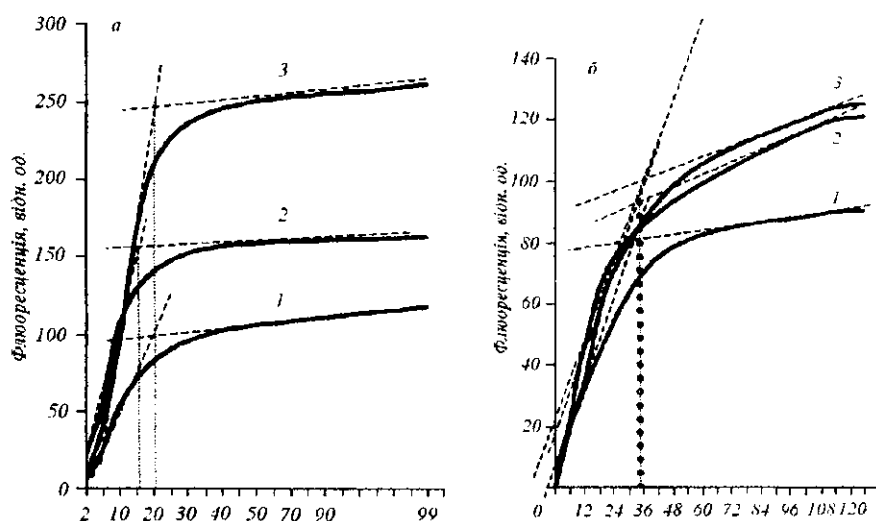


Рис. 4. Графіки флюоресцентного титрування ціанінових барвників: К-Т (1); К-7 (2); К-6 (3) нуклеїновими кислотами ДНК (а) та РНК (б)

тного випромінювання комплексів К-6, К-Т з ДНК настає при співвідношенні одна молекула барвника на 20 пар основ (рис. 4, а, криві 1, 3), а для

барвника К-7 — на 16 пар основ (рис. 4, а, крива 2).

Насичення інтенсивності флюоресцентного ви-

промінювання комплексу К-6 з РНК настає при співвідношенні одна молекула барвника на 38 основ (рис. 4, б, крива 3), К-Т — на 34 основи (рис. 4, б, крива 1), а для барвника К-7 — на 36 основ (рис. 4, б, крива 2). Оскільки РНК на відміну від ДНК не має регулярної структури, перегин кривої титрування є нечітким.

При високому співвідношенні концентрацій НК—барвник (50 пар основ на молекулу барвника для ДНК та 100 основ на молекулу барвника для РНК) спостерігалось підвищення інтенсивності флюоресценції на довжині хвилі випромінювання комплексу в 2000 разів для ДНК та в 1400 разів для РНК.

Спектри збудження флюоресценції барвників та їхніх комплексів з НК. У спектрах поглинання розчинів ціанінів з НК спостерігається декілька смуг. Тому для встановлення відповідності між ними та максимумами випромінювання нами були зареєстровані спектри збудження барвників та їхніх комплексів з НК (табл. 7, 8.).

Спектри збудження флюоресценції розчинів барвників у ДМФА (довжина хвилі випромінювання $\lambda_{em} \approx 490$ нм) містять одну смугу ($\lambda_{max} \approx 448$ нм) і практично збігаються зі спектрами поглинання відповідних барвників (табл. 8).

Спектри збудження довгохвильової флюоресценції (довжина хвилі випромінювання $\lambda_{em} = 570$ — 585 нм) барвників у водному буфері містять дві смуги — більш інтенсивну на 410–420 нм, та менш інтенсивну на ≈ 450 нм:

Барвник	λ_{ex} , нм
К-Т	412; 450
К-7	420; 450
К-6	410; 450

Таким чином, можна припустити, що для розчинів ціанінів досліджуваних концентрацій у водному буфері основний внесок у випромінювання вносять агрегати барвників.

Максимуми спектрів збудження флюоресценції розчинів ціанінів з НК ($\lambda_{fm} \approx 490$ нм) знаходяться в межах ≈ 450 — 455 нм (табл. 8), що відповідає розташуванню максимуму молекулярного поглинання барвника. При збудженні цих розчинів на довжині хвилі поглинання агрегатів ($\lambda \approx 410$ — 430 нм) максимум флюоресценції знаходиться при 570 нм, тобто на довжині хвилі випромінювання агрегатів розчинів вільного барвника. В цьому випадку зростання інтенсивності флюоресценції було незначним (5—10 раз, даних не наведено).

На нашу думку, велика різниця між положеннями максимумів флюоресценції розчинів вільних барвників та в присутності НК пояснюється тим, що у водному розчині випромінюють переважно агрегати димерних та тримерних ціанінових барвників ($\lambda_{em} \approx 570$ нм), а при взаємодії з НК гомодита гомотримерні ціаніни частково переходять у мономерну форму, яка випромінює на $\lambda_{em} \approx 490$ нм. Подібний ефект вперше було виявлено і детально вивчено в [16] для мономерних ціанінових барвників. Агрегаційна здатність гомо-*n*-мерних ціанінів набагато вища, ніж мономерних барвників.

У водних розчинах у вільному стані *n*-мерні ціаніни знаходяться переважно в агрегованій формі, що зумовлює пониження рівня випромінювання власної флюоресценції барвника на довжині хвилі мономерної форми. При взаємодії з НК ціанінові барвники частково переходять у мономерну форму, утворюючи високофлюоресцентні комплекси. Зниження рівня власної флюоресценції вільного *n*-меру на довжині хвилі випромінювання мономерної форми барвника призводить до збільшення відношення сигнал/шум. Таким чином, підвищується чутливість *n*-мерних ціанінів при детекції НК.

Спектри лінійного дихроїзму комплексів барвників з дсДНК. Результати дослідження спектрів лінійного дихроїзму мономерного барвника Суап 40 та димерного барвника з жорсткішим лінкером К-6 і тримерного барвника К-Т, отримані при високому

Таблиця 8

Максимуми спектрів збудження флюоресценції вільних ціанінових барвників та їхніх комплексів з НК при $\lambda_{em} = 490$

Барвник	ДМФА, λ_{ex} , нм	Буфер, λ_{ex} , нм	Буфер + ДНК, λ_{ex} , нм	Буфер + РНК, λ_{ex} , нм
К-Т	447	425	450	447
К-7	448	428	455	455
К-6	448	430	455	452

співвідношенні ДНК, пари основ/барвник (рис. 5), показали, що площини молекул хромофорів барвників у всіх випадках розташовані перпендикулярно до довгої осі дсДНК (для всіх ціанінів величина LD_{\parallel} є від'ємною). Таке розташування хромофорів може свідчити про інтеркаляційний характер взаємодії як базового мономерного ціаніну, так і одержаних на його основі гомоди- та гомотримерних барвників.

Оскільки, на нашу думку, для тримерного ціаніну завдяки властивостям лінкера інтеркаляція в одну молекулу дсДНК є малоімовірною, ми можемо припустити для нього утворення міжмолекулярних інтеркаляційних комплексів (інтеркаляція хромофорів однієї молекули тримеру в дві різні молекули дсДНК). Паралельне існування таких комплексів було раніше запропоновано для бісінтеркаляторів — диакридинів та лізопептину А [17]. Також не виключено, що міжмолекулярні інтеркаляційні комплекси реалізуються для досліджених гомодимерів.

Можливі структури агрегатів вільних барвників та в присутності НК. Відомо, що ціанінові барвники плоскої будови в полярних середовищах схильні до утворення Н-агрегатів «сандвічевого»

типу, що супроводжується появою нових короткохвильових смуг поглинання та гасінням власної флюоресценції [11, 13, 14]. Поява декількох короткохвильових максимумів у спектрі поглинання свідчить про утворення агрегатів, що включають у себе різну кількість молекул мономерного барвника. Можливість утворення тримерних агрегатів було показано на прикладі бісінтеркалюючих антрациклінових антибіотиків [18], барвника метиленового блакитного (Methylene Blue) [19] та тіокарбоціанінів [13]. Відомо, що збільшення кількості хромофорів, які входять до складу Н-агрегату, призводить до появи додаткових максимумів, розташованих в більш короткохвильовій області відносно положення мономерної смуги поглинання [12, 13]. У спектрах поглинання барвників К-6, К-7, К-Т, окрім мономерного максимуму поглинання, спостерігаються два додаткових максимуми в короткохвильовій області, що, на нашу думку, свідчить про утворення Н-агрегатів двох видів; причому більш короткохвильовій смугі ag_{r1} відповідає агрегат, у якому взаємодіють між собою три хромофори, а менш короткохвильовій смугі поглинання ag_{r2} — агрегат, у якому взаємодіють між собою тільки два хромофори.

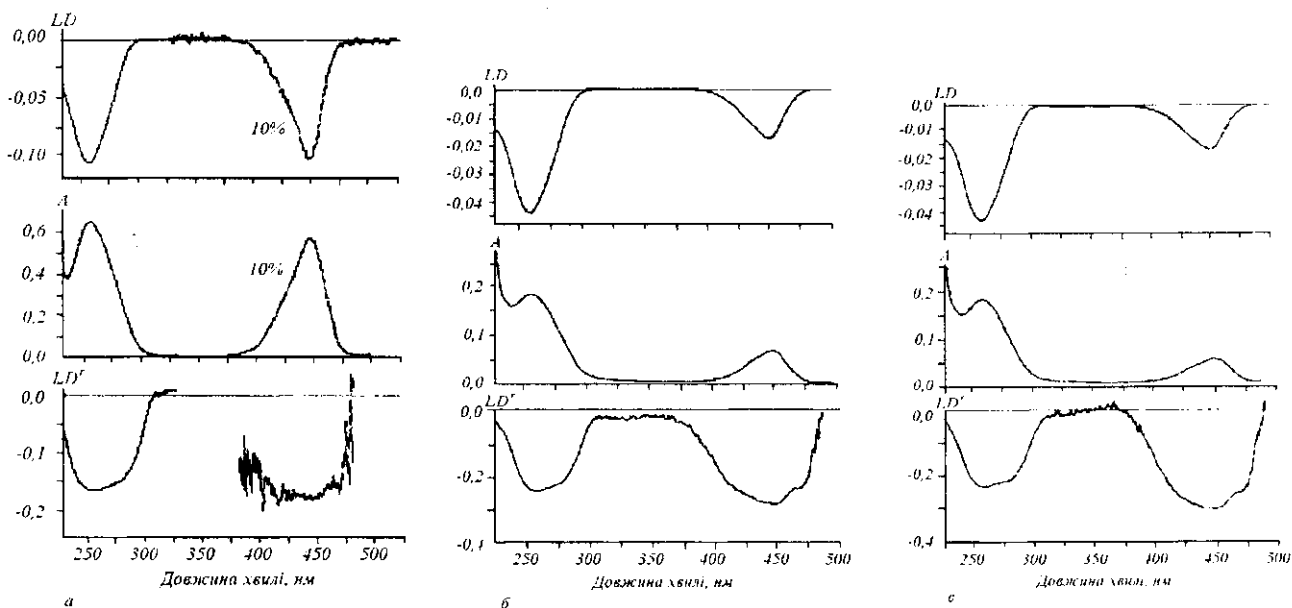


Рис. 5. Спектри лінійного дихроїзму (LD), поглинання (A) та зведеного лінійного дихроїзму (LD') барвників Суан40 (а), К-6 (б) та К-Т (в) у комплексах з дсДНК

При нагріванні водних розчинів вільних барвників від 20 до 80 °С для барвників К-6 і К-Т спостерігалось зменшення інтенсивності і поступове зникнення агрегаційного піка $agr1$ та поява і зростання другого агрегатного максимуму $agr2$. Для барвника К-7 відмічено зникнення максимуму $agr1$ та зростання $agr2$. Для всіх ціанінів при нагріванні зростала інтенсивність молекулярного максимуму поглинання ($\lambda \approx 450$ нм) (даних не наведено).

Таким чином, виходячи з вищенаведеного, нами було запропоновано низку можливих агрегатних структур (рис. 6), що теоретично можуть існувати і не суперечити експериментальним даним.

Ми вважаємо, що смузі поглинання $agr1$ відповідають агрегати структури D^3 та T^3 , а смузі поглинання $agr2$ — D^2 та T^2 для гомодимерних та гомотримерних ціанінових барвників відповідно (рис. 2, 3, 6).

Для барвника К-7 переважність утворення

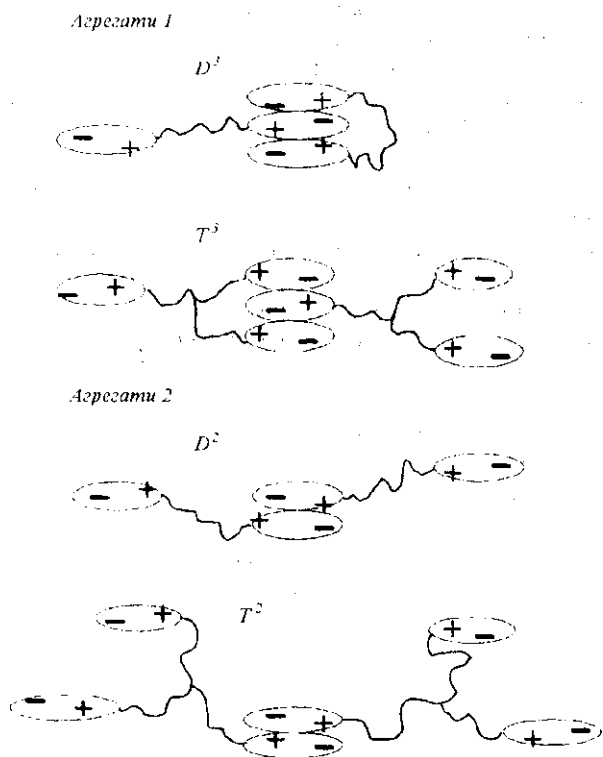


Рис. 6. Запропоновані структури агрегатів гомодимерних ціанінів (D^2 , D^3) та гомотримерного барвника (T^2 , T^3). Заряди розставлено згідно з полярністю ядер [10]

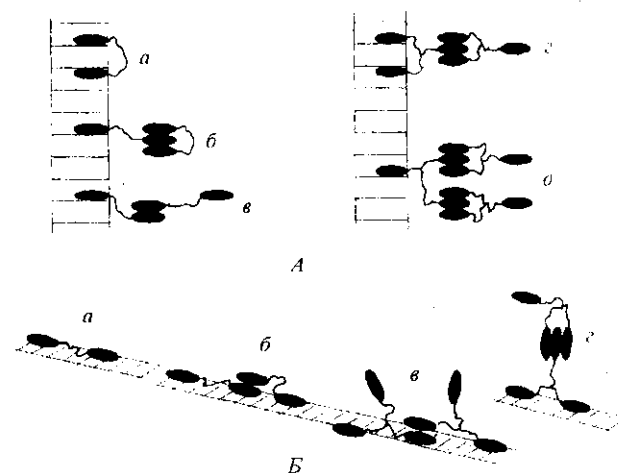


Рис. 7. Можливі структури агрегаційних комплексів ціанінових барвників з НК: А — при взаємодії за інтеркаляційним механізмом (а — бісінтеркаляція; б — інтеркаляція гомодимеру одним хромофором і утворення агрегатної структури, подібної до D^3 (рис. 5); в — інтеркаляція гомодимеру одним хромофором і утворення агрегаційної структури, подібної до D^2 (рис. 5); г — бісінтеркаляція гомотримеру і утворення агрегаційної структури, подібної до T^3 (рис. 5); д — інтеркаляція гомотримеру одним хромофором і утворення комплексу агрегаційної структури, подібної до T^3 (рис. 5)); Б — при взаємодії з боріздкою (а — «налипання» гомодимеру на спіраль НК; б — утворення агрегаційної структури, подібної до D^2 (рис. 5); в — утворення агрегаційної структури, подібної до T^2 (рис. 5); г — утворення агрегаційної структури, подібної до T^3 (рис. 5))

структури D^2 може бути пояснена тим, що довгий гідрофобний аліфатичний лінкер цього гомодимерного ціаніну у водному середовищі збирається в клубок, який перешкоджає утворенню агрегата структури D^3 . Лінкери барвників К-6 та К-Т мають жорсткіше закріплені аліфатичні ланцюжки, внаслідок чого структури D^3 та T^3 є для них імовірнішими.

Взаємодія ціанінових барвників з дсДНК може відбуватися за двома механізмами: інтеркаляційному та через взаємодію з великою чи малою борозденками НК [20]. При взаємодії за інтеркаляційним механізмом, запропонованим для барвника ТОТО авторами роботи [21, 22], хромофори гомодимерного ціаніну повністю розміщуються в порожнині між парами основ НК, причому залишок бензтіазолу знаходиться між піримідинами, а хіноліну — між пуринами (рис. 7, А, а). Дослідження взаємодії між дсДНК та YOYO показали, що

при співвідношенні, вищому ніж 8 : 1 (пари основ : барвник), переважаючим типом взаємодії є біс-інтеркаляція. При нижчому співвідношенні стає помітним внесок зовнішнього механізму зв'язування (рис. 7, Б, а). Для YOYO зовнішній механізм зв'язування проявляється тоді, коли заповнено всі посадкові місця, що існують згідно з принципом виключення сусідніх пар основ [15].

При взаємодії з НК значна частина агрегатів руйнується та фіксується мономерна форма барвника, про що свідчить зростання молекулярної смуги в спектрах поглинання та значне підвищення інтенсивності флюоресценції [23].

На рис. 7, А, наведено можливі структури агрегатних комплексів гомодимерних ціанінових барвників з ДНК. Можна припустити, що при взаємодії гомодимеру з дсДНК за інтеркаляційним механізмом, коли один з хромофорів проінтеркалював, а інший перебуває у нез'язаному стані, для такого нез'язаного хромофора з'являється можливість агрегаційної взаємодії з іншою молекулою ціанінового гомодимеру (рис. 7, А, б). Таким чином, для барвників К-6 і К-7 можливе утворення структури D^3 , що проявляється в спектрах поглинання наявністю агрегатного максимуму $agr1$. Для барвника К-7 наявність максимуму $agr2$ може свідчити про утворення структури D^2 (рис. 7, А, в).

На рис. 7, Б, представлено можливі структури агрегатних комплексів гомодимерних ціанінових барвників, що утворюються при фіксації барвника шляхом «налипання» в борозденку. Один з хромофорів гомодимерного ціаніну може, взаємодіючи з хромофором не зв'язаною з ДНК молекулою барвника, утворювати агрегат структури D^2 , якому відповідає агрегатний максимум $agr2$ у спектрах поглинання комплексу барвник—НК (рис. 7, Б, б). Можливість утворення потрійної структури D^3 для гомодимерів у цьому випадку малоймовірна, оскільки кожен з хромофорів гомодимерного барвника, що вже «налипли» на ланцюг НК, може взаємодіяти лише з одним хромофором вільної молекули ціанінового гомодимеру, утворюючи тільки подвійну структуру D^2 . Це підтверджується відсутністю в спектрах поглинання комплексів барвників К-6 та К-7 з РНК максимуму $agr1$.

Можливі структури агрегатних комплексів гомотримерних ціанінових барвників з НК наведено на рис. 7. Для барвника К-Т у комплексі з ДНК максимуму поглинання $agr2$ не спостерігається. Така поведінка гомотримерного ціаніну, можливо, пояснюється тим, що при інтеркаляційному механізмі взаємодії з ДНК у барвника К-Т залишається хоча б один нез'язаний хромофор, який може утворювати агрегати структури T^3 (рис. 7, А,

з, д), що відповідає максимуму $agr1$ у спектрі поглинання.

При реалізації механізму «налипання» на РНК для барвника К-Т у спектрах поглинання, зареєстрованих після 5 хв витримки, спостерігаються два агрегатних максимуми: $agr1$ та $agr2$ (табл. 2). На наш погляд, при цьому утворюються два типи агрегатів: подвійний T^2 (рис. 7, Б, а) та потрійний T^3 (рис. 7, Б, з). Після витримки протягом 20 год структура T^3 переходить у структуру T^2 , що проявляється в спектрах поглинання зникненням максимуму $agr1$ та зростанням максимуму $agr2$ (табл. 3). Така поведінка барвника К-Т, скоріше за все, зумовлена тим, що взаємодія з ДНК та РНК відбувається за різними механізмами.

Висновки. 1. При вивченні спектрально-люмінесцентних властивостей нових гомоді- та гомотримерних бензотіазолопіридинієвих ціанінових барвників та їхніх комплексів з НК показано, що різниця між максимумами випромінювання вільних барвників та їхніх комплексів з НК становить майже 100 нм. На довжині хвилі флюоресценції комплексів барвник—НК власна флюоресценція барвників знаходиться практично на рівні фону. Таким чином, для досліджених ціанінів реальне підвищення випромінювання становить 950—1200 разів для ДНК та 500—800 — для РНК. Отже, ці барвники можуть бути використані як ефективні флюоресцентні зонди для детекції нуклеїнових кислот.

2. Було встановлено, що досліджені барвники у водному розчині утворюють два типи Н-агрегатів, які існують у різних співвідношеннях у вільному стані та в присутності НК.

3. Запропоновано можливі структури агрегатів для вільних гомоді- та гомотримерних ціанінових барвників та в присутності НК.

И. А. Кочешев, В. Б. Ковальская, С. Н. Ярмолюк, Б. Акерман, Г. Х. Мацука

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 15. Спектрально-люминесцентные свойства новых бензотиазолметилден-2,5-диметилпиридиниевых гомодимерных и гомотримерных цианиновых красителей и их комплексов с нуклеиновыми кислотами

Резюме

Изучены спектрально-люминесцентные свойства новых гомоді- і гомотримерних ціанінових красителей і їх комплексів з нуклеїновими кислотами (НК). Исследованные цианины продемонстрировали увеличение интенсивности излучения приблизительно в 1200 раз в комплексах с ДНК и в 800 раз в комплексах с РНК, что делает их перспективными для использования в качестве флюоресцентных зондов при детекции НК. Сделано предположение относительно характера и природы агрегатов свободных красителей и их комплексов с НК. На

основаним на отриманих даних пропонується можливі структури агрегатних комплексів в вільному стані та в присутності НК.

I. O. Kocheshev, V. B. Kovalska, S. M. Yarmoluk, B. Akerman, G. Kh. Matsuka

Interaction of nucleic acids with cyanine dyes. 15. Spectral-fluorescence properties of novel benzothiazolmethilene-2,5-dimethylpyridine homodi- and homotrimer cyanine dyes and their complexes with nucleic acids

Summary

Spectral properties of novel homodi- and homotrimer cyanine dyes and their complexes with nucleic acids have been investigated. The dyes studied have shown the increasing of fluorescence intensity up to 1200 and 800 times under the binding with the DNA and with the RNA respectively which make them promising as fluorescent probes for nucleic acids detection. The nature and character of aggregation of free and complexed dyes have been studied. Possible aggregate structures have been proposed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Gaugain B., Barbet J., Le Pecq J.-B. Fluorescence properties and DNA binding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer // *Biochemistry*.—1978.—17, N 24.—P. 5078—5088.
- Rye H. S., Dabora J. M. Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity // *Anal. Biochem.*—1993.—208.—P. 144—150.
- 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.
- Wirth M., Buchard O., Koch T., Nielsen P. E., Norden B. Interaction between DNA and mono-, bis-, tris-, tetrakis-, and hexakis (aminoacridines). A linear and circular dichroism, electric orientation relaxation, viscometry, and equilibrium study // *J. Amer. Chem. Soc.*—1988.—110.—P. 932—939.
- 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—383.
- 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.
- Goodwin P., Johnson M., Martin J. Rapid sizing of individual fluorescently staining fragments by flow cytometry // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21.—P. 803—806.
- Carlsson C., Larsson A., Johnson M., Norden B. Dancing DNA in capillary solution electrophoresis // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—117.—P. 3871—3872.
- Кочешев І. О., Ковальська В. Б., Ярмолюк С. М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 11. Синтез та спектральні властивості нових 2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридинієвих гомодимерних ціанінових барвників // *Біополімери і клітина*.—1999.—15, № 5.—С. 449—455.
- Кочешев І. О., Криворотенко Д. В., Ярмолюк С. М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 13. Синтез нових 2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум-2-іл)метилен]-1,4-дигідро-1-піридинієвих гомодимерних та гомотримерних ціанінових барвників // *Укр. хім. журн.*—1999 ? Друкується.
- Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—231 с.
- Emerson E. S., Conlin M. A., Rosenoff A. E., Norland K. S., Rodriguez H., Chin D., Bird G. R. The geometrical structure and absorption spectrum of a cyanine dye aggregate // *J. Phys. Chem.*—1967.—71, N 8.—P. 2396—2403.
- Herz A. H. Dye-dye interaction of cyanines in solution and at AgBr surfaces // *Photo. Sci. and Engin.*—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.
- Larsson A., Carlsson C., Jonsson M., Albinsson B. Characterization of the binding of the fluorescent dyes YO and YOYO by polarized light spectroscopy // *J. Amer. Chem. Soc.*—1994.—116.—P. 8459—8465.
- Огульчанський Т. Ю., Яцук В. М., Ярмолюк С. М., Лосицький М. Ю. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 14. Деякі спектральні особливості мнометинових бензотіазолових ціанінових барвників та їхньої взаємодії з ДНК // *Біополімери і клітина*.—Друкується.
- Huang C., Mirabelli C., Mong S. Intermolecular cross-linking of DNA through bifunctional intercalation of an antitumor antibiotic, lizopeptin A (BBM-928A) // *Cancer Res.*—1983.—43.—P. 2718—2724.
- Leng F., Priebe W., Chaires J. Ultralight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic // *Biochemistry*.—1998.—37.—P. 1743—1753.
- Jockusch S., Turro N. J., Tomalia D. A. Aggregation of methylene blue adsorbed on starburst dendrimers // *Macromolecules*.—1995.—28.—P. 7416—7418.
- Timicheva I. I., Maximova V. A., Ivanov I. G. Fluorescence spectral characteristics of novel asymmetric monomethine cyanine dyes in nucleic acid solutions // *FEBS Lett.*—1997.—405.—P. 141—144.
- 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.
- Staeck 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.
- Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Smirnova T. V., Shandura M. P., Kovtun Y. P., Matsuka G. Kh. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 2. Spectroscopic properties of methyleneoxy analogues of Thiazole Orange // *Biopolymery i Kletka*.—1996.—12, N 6.—P. 74—81.

УДК 542.95

Надійшла до редакції 25.02.99