

## Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 9. Вивчення спектральних властивостей комплексів ціанінових барвників з ДНК у присутності органічних розчинників

М. Ю. Лосицький, В. Б. Ковальська, С. М. Ярмолюк

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

*У роботі досліджено вплив полярності середовища на спектрально-люмінесцентні властивості монометинових ціанінових барвників та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами. Показано, що присутність органічного розчинника у водних розчинах барвників та їхніх комплексів з ДНК призводить до суттєвого зменшення інтенсивності флюоресценції комплексів барвник—ДНК і до зростання інтенсивності власної флюоресценції барвників. Інтенсивність флюоресценції комплексів бромистий етидид—ДНК слабо залежить від природи органічного розчинника, що може бути пояснено з урахуванням інтеркаляційного механізму взаємодії. Для ціанінових барвників, досліджених у роботі, ця залежність є значно сильнішою, що свідчить про значний контакт зв'язаного з ДНК барвника з оточуючим середовищем. Разом з тим взаємодія даних барвників з ДНК не виявила характерної для борозенкової взаємодії специфічності до АТ-ділянок. Таким чином, припускається, що досліджені в представленій роботі ціанінові барвники взаємодіють з ДНК за механізмом «напівінтеркаляції».*

Вступ. Протягом останніх років багато уваги приділяється застосуванню полі- та монометинових ціанінових барвників як флюоресцентних зондів для дослідження біологічних об'єктів. Деякі ціаніни, маючи низьку інтенсивність власної флюоресценції, збільшують її на порядки при взаємодії з нуклеїновими кислотами [1]. Використання цих барвників є найчутливішим оптичним методом для визначення одно- та двоспіральної ДНК та РНК в агарозних гелях [1]; аналізу ДНК за допомогою капілярного електрофорезу [2] та візуалізації ДНК у флюоресцентній та лазерній конфокальній мікроскопії [3].

Відомо, що спектральні властивості розчинів ціанінових барвників залежать від полярності розчинника [4].

Більшість катіонних монометинових ціанінових барвників у полярних водних розчинах утворюють молекулярні агрегати. Результатом агрегаційних процесів, як правило, є поява додаткових

смуг у спектрах поглинання та зменшення інтенсивності власної флюоресценції барвників. При пониженні полярності водного середовища рівновага мономер—агрегат зміщується в бік мономера, внаслідок чого агрегаційні смуги в спектрах поглинання зменшуються чи зникають, а інтенсивність власної флюоресценції зростає [4].

У попередніх дослідженнях нами показано, що взаємодія ціанінів з нуклеїновими кислотами супроводжується процесами агрегації, в результаті чого якість барвників як флюоресцентних зондів погіршується [5]. Метою даної роботи було вивчення впливу зниження агрегації шляхом додавання органічних розчинників на флюоресцентні властивості ціанінових барвників та їхніх комплексів з ДНК.

**Матеріали і методи. Підготовка стокових розчинів барвників та нуклеїнових кислот.** Для отримання стокових розчинів концентрації  $2 \cdot 10^{-3}$  М барвники були розчинені в ДМФА. За цих умов вони залишалися стабільними протягом декількох місяців на протипагу їхнім водним розчинам, що з

часом значною мірою втрачали свої флюоресцентні властивості.

Для всіх спектральних досліджень використовували буфер 0,05 М трис-НСІ, рН 7,5.

Стокові розчини нуклеїнових кислот концентрації  $6 \cdot 10^{-3}$  М пар основ готували в зазначеному буфері (в роботі використано тотальну ДНК з еритроцитів курчат 6500—7500, «Reanal», Угорщина) та полінуклеотиди poly(dA)·poly(dT) та poly(dG-dC)·poly(dG dC) фірми «Sigma» (США).

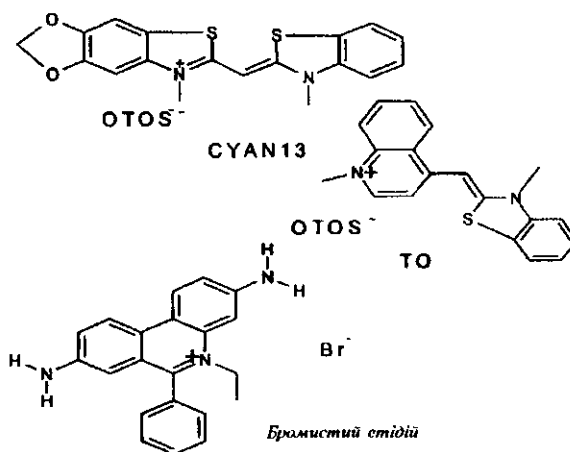
Робочі розчини вільних барвників та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами готували розведенням відповідних стокових розчинів у буфері або в суміші 85 % буфера та 15 % органічного розчинника. Концентрація барвників в усіх досліджуваних розчинах становила  $10^{-5}$  М. Концентрації нуклеїнових кислот дорівнювали  $6 \cdot 10^{-5}$  М пар основ. Таким чином, співвідношення складових комплексу нуклеїнова кислота—барвник становило приблизно 1 молекула барвника до 6 пар нуклеотидних основ.

Спектроскопічні виміри здійснювали одразу ж після приготування робочих розчинів. Спектри поглинання одержані на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина). Флюоресцентні властивості барвників та їхніх комплексів з ДНК досліджували за допомогою флюоресцентного спектрофотометра Hitachi Model 850 (Японія). Флюоресценцію збуджували Хе лампою (150 Вт). Всі виміри проводили в кварцевій кюветі (1,0 × 1,0 см).

У роботі було використано бромистий етидій фірми «Sigma». Ціанінові монометинові барвники тіазоловий оранжевий (ТО) та Суап 13 були люб'язно надані нам Ю. Г. Ковтуном (структурні формули барвників представлено на схемі).

Результати. Спектральні властивості барвника Суап 13 та його комплексів з ДНК. Характеристики спектрів поглинання та флюоресценції барвника Суап 13 та його комплексів з ДНК наведено в табл. 1, 2.

Вільний барвник. Довжини хвиль максимумів мономерної ( $\lambda_{\text{abs}}^{\text{mol}}$ ) та агрегаційної ( $\lambda_{\text{abs}}^{\text{ag}}$ ) смуг у спектрах поглинання розчинів вільного барвника практично не змінюються при зміні полярності середовища. У буфері та сумішах буфер—органічний розчинник максимуми поглинання мономерів розташовані на 439—440 нм, а агрегатів — на 418—420 нм. При пониженні полярності середовища співвідношення оптичних густин розчину на довжинах хвиль поглинання мономерів та агрегатів ( $D^{\text{mol}}/D^{\text{ag}}$ ) зростає від 0,98 (буфер) до 1,18 (буфер—гліцерин). У спектрах поглинання розчину Суап 13 у суміші буфера з ацетоном, діоксаном та ДМФА агрегаційна смуга практично зникає.



Структурні формули барвників

Максимум у спектрі флюоресценції ( $\lambda_{\text{flu}}$ ) розчину барвника в буфері знаходиться на 520 нм, а в присутності органічних розчинників зсувається у короткохвильову ділянку спектра на 5—10 нм. Інтенсивність флюоресценції при цьому в двох випадках (при додаванні метилового спирту та ДМСО) незначно зменшується (на 5—15 %), а в решті випадків зростає в 1,17—2,6 рази.

Комплекси барвника з ДНК. У спектрах поглинання комплексів барвника Суап 13 з ДНК при пониженні полярності середовища спостерігаються такі ж зміни, як і в спектрах вільного барвника. Так, в усіх середовищах (буфері та сумішах) максимуми поглинання мономерів (вільних молекул та тих, що утворюють комплекси з ДНК) розташовані на 439—441 нм, а агрегатів — на 418—420 нм. При пониженні полярності середовища співвідношення  $D^{\text{mol}}/D^{\text{ag}}$  зростає від 1,03 (буфер) до 1,25 (суміш буфер—ДМСО). В спектрах поглинання розчину комплексів Суап 13 з ДНК у суміші буфера з ацетоном, діоксаном та ДМФА агрегаційна смуга практично зникає.

На відміну від поглинання в спектрах флюоресценції комплексів барвник—ДНК у присутності органічних розчинників спостерігаються зовсім інші зміни, ніж у спектрах вільного барвника. Максимуми флюоресценції комплексів барвник—ДНК ( $\lambda_{\text{flu}}^{\text{DNA}}$ ) у присутності різних органічних розчин-

Таблиця 1

Характеристики спектрів поглинання барвників Суап 13, ТО та їхніх комплексів з ДНК

Органічний розчинник	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{mol}}$ , нм	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{ag}}$ , нм	$D^{\text{mol}}/D^{\text{ag}}$	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{mol}}$ ДНК, нм	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{ag}}$ ДНК, нм	$D^{\text{mol}}/D^{\text{ag}}$ ДНК
<i>Суап 13</i>						
Буфер	439	418	0,98	441	420	1,03
Метанол	439	418	1,13	439	418	1,08
Етанол	439	418	1,13	439	418	1,12
Ізопропанол	439	418	1,13	439	418	1,12
Гліцерин	439	418	1,18	440	420	1,16
Ацетон	439	—	—	439	—	—
Діоксан	440	—	—	440	—	—
ДМФА	440	—	—	440	—	—
ДМСО	439	420	1,17	440	420	1,25
<i>ТО</i>						
Буфер	502	474	0,97	502	476	1,10
Метанол	502	476	1,19	503	478	1,25
Етанол	502	476	1,25	504	478	1,31
Ізопропанол	502	476	1,35	503	478	1,41
Гліцерин	503	476	1,19	504	478	1,23
Ацетон	501	—	—	502	—	—
Діоксан	503	—	—	504	—	—
ДМФА	503	—	—	503	—	—
ДМСО	502	—	—	503	—	—

ників розташовані на 485—495 нм (у чистому буфері даний максимум знаходиться на 492 нм). Інтенсивність флюоресценції комплексів ( $I_{\text{flu}}^{\text{DNA}}$ ) в сумішах буфер—органічний розчинник зменшується відносно флюоресценції в буфері на 16—77 %.

*Спектральні властивості ТО та його комплексів з ДНК.* Результати спектральних досліджень ТО та комплексів ТО—ДНК наведені в табл. 1, 2.

*Вільний барвник.* У спектрах поглинання мономерні максимуми в різних середовищах (буфері та сумішах буфер—органічний розчинник) знаходяться в інтервалі 501—503 нм, а агрегаційні — в інтервалі 474—476 нм. При пониженні полярності середовища співвідношення  $D^{\text{mol}}/D^{\text{ag}}$  змінюється в межах від 0,97 (буфер) до 1,35 (суміш буфер—ізопропіловий спирт). У спектрах поглинання розчину ТО в суміші буфера з ацетоном, діоксаном, ДМСО та ДМФА агрегаційна смуга практично зникає.

Вільний ТО практично не флюоресцює в буфері, і тому не спостерігається чіткого максимуму випромінювання, а при пониженні полярності середовища максимум флюоресценції барвника ( $\lambda_{\text{flu}}$ ) знаходиться на 560—570 нм. Інтенсивність флюоресценції при цьому зростає в 1,13—7,0 разів.

*Комплекси барвника з ДНК.* Мономерні максимуми в спектрах поглинання комплексів ТО—ДНК розташовані в інтервалі 502—504 нм, а агрегаційні — 476–478 нм. Співвідношення  $D^{\text{mol}}/D^{\text{ag}}$  зростає від 1,10 (буфер) до 1,41 (суміш буфер—ізопропіловий спирт). У спектрах поглинання розчину комплексів ТО—ДНК в суміші буфера з ацетоном, діоксаном, ДМСО та ДМФА агрегаційна смуга не проявляється.

Максимуми флюоресценції комплексів барвник—ДНК ( $\lambda_{\text{flu}}^{\text{DNA}}$ ) в різних середовищах знаходяться в інтервалі 538—540 нм. Інтенсивність флюоресценції ( $I_{\text{flu}}^{\text{DNA}}$ ) в сумішах буфер—органічний

Таблиця 2

Характеристики спектрів флюоресценції барвників Суан 13, ТО та їхніх комплексів з ДНК

Органічний розчинник	$\lambda_{fl}$ , нм	$I_{fl}$ , в. о.	$\lambda_{fl}^{ДНК}$ , нм	$I_{fl}^{ДНК}$ , в. о.
<i>Суан 13</i>				
Буфер	520	0,227	492	28,2
Метанол	515	0,194	495	11,0
Етанол	515	0,265	495	15,35
Ізопропанол	515	0,31	490	17,94
Гліцерин	515	0,294	493	23,8
Ацетон	510	0,38	490	7,06
Дюксан	505	0,6	490	6,45
ДМФА	505	0,316	490	8,75
ДМСО	510	0,215	485	11,0
<i>ТО</i>				
Буфер	—	0,04	538	12,1
Метанол	—	0,045	538	9,34
Етанол	570	0,1	540	8,3
Ізопропанол	570	0,08	540	10,5
Гліцерин	565	0,06	540	9,86
Ацетон	560	0,21	540	6,37
Дюксан	557	0,28	540	5,13
ДМФА	560	0,06	540	5,85
ДМСО	560	0,073	540	10,23

розчинник зменшується відносно флюоресценції в буфері на 13—58 %.

*Спектральні властивості бромистого етидію та його комплексів з ДНК.* Параметри спектрів поглинання та флюоресценції бромистого етидію та його комплексів з ДНК представлені в табл. 3.

*Вільний барвник.* Спектри поглинання бромистого етидію у видимій області мають вигляд однієї досить широкої смуги без будь-якої помітної структури. Максимум поглинання в буфері знаходиться на 482 нм, а в присутності органічних розчинників він значно зсувається (до 14 нм) у довгохвильовий бік.

Максимум флюоресценції в буфері знаходиться на 623 нм, а при додаванні органічних розчинників він зміщується (до 5 нм) у довгохвильовий бік. Інтенсивність флюоресценції при зменшенні полярності середовища зростає на 30—120 %.

*Комплекси барвника з ДНК.*

Спектри поглинання комплексів бромистий етидію—ДНК зміщені в довгохвильовий бік на 12—34 нм відносно спектрів вільного барвника, хоча не відрізняються від них за формою. Максимум поглинання комплексів у буфері знаходиться на 516 нм, а при пониженні полярності середовища зміщується (до 10 нм) у короткохвильову ділянку спектра.

Положення максимуму флюоресценції комплексу барвник—ДНК у різних середовищах залишається незмінним (610 нм), лише в суміші буфер—ДМФА спостерігається зсув у довгохвильовий бік на 5 нм. Інтенсивність флюоресценції комплексу з ДНК при додаванні органічних розчинників зменшується на 22—29 % відносно флюоресценції в буфері.

*Спектральні властивості комплексів ціанінових барвників ТО та Суан 13 з полінуклеотидами.* Було також досліджено спектрально-лю-

Таблиця 3

Спектрально-люмінесцентні характеристики бромистого етидію та його комплексів з ДНК

Органічний розчинник	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{ДНК}}$ , нм	$\lambda_{\text{flu}}$ , нм	$I_{\text{flu}}$ , в. о.	$\lambda_{\text{flu}}^{\text{ДНК}}$ , нм	$I_{\text{flu}}^{\text{ДНК}}$ , в. о.
Буфер	482	516	623	0,408	610	22,6
Метанол	488	510	623	0,53	610	1,92
Етанол	488	513	623	0,6	610	1,84
Ізопропанол	490	513	625	0,72	610	1,88
Гліцерин	488	516	627	0,58	610	1,95
Ацетон	494	506	627	0,83	610	1,93
Діоксан	494	510	628	0,80	610	1,88
ДМФА	496	508	628	0,89	615	2,03
ДМСО	491	510	628	0,82	610	1,90

Таблиця 4

Характеристики спектрів флюоресценції барвників Суап 13 і ТО та їх комплексів з полінуклеотидами poly(dA)·poly(dT) та poly(dG-dC)·poly(dG-dC)

Барвник	$\lambda_{\text{abs}}$ dA-dT, нм	$\lambda_{\text{flu}}$ dA-dT, нм	$I_{\text{flu}}$ dA-dT, в. о.	$\lambda_{\text{abs}}$ d(GC/GC), нм	$\lambda_{\text{flu}}$ d(GC/GC), нм	$I_{\text{flu}}$ d(GC/GC), в. о.
Суап 13	442	495	9,7	442	491	40
ТО	508	537	14,2	508	537	14,3

мінесцентні властивості ціанінових барвників ТО та Суап 13 у присутності полінуклеотидів poly(dA)·poly(dT) та poly(dG-dC)·poly(dG-dC) у буфері. Результати наведено в табл. 4. Форми спектрів випромінювання та розташування максимумів для досліджених барвників у відповідних комплексах з полінуклеотидами та ДНК практично не відрізняються. У випадку барвника Суап 13 інтенсивність випромінювання для комплексів з poly(dG-dC)·poly(dG-dC) більше ніж у чотири рази перевищує інтенсивність флюоресценції комплексів цього ціаніну з poly(dA)·poly(dT). Для барвника ТО значення інтенсивності випромінювання комплексів з різними полінуклеотидами практично не відрізняються.

Обговорення результатів. Катіонні монометинові ціанінові барвники викликають особливий інтерес завдяки їхньому застосуванню в молекулярній біології та біоорганічній хімії як флюоресцентних зондів. Відомо, що в більшості випадків агрегація цих барвників у водних розчинах веде до утворення нефлюоресцентних асоціатів, що пони-

жує чутливість методу. Це явище можна усунути, вводячи в структуру молекули сильнополярні групи, які підвищують розчинність барвника у воді (наприклад,  $\text{SO}_3^-$ ), об'ємних замісників, а також варіацією полярності середовища [4, 5].

У літературі описано два основних способи нековалентної взаємодії ДНК з іншими молекулами (в тому числі і з флюорофорами), а саме: 1) розміщення молекули, що взаємодіє з ДНК, у борозенці ДНК і стабілізація її сукупністю гідрофобної, електростатичної та водневої взаємодій та 2) інтеркаляція, тобто вбудовування планарної частини молекули між сусідніми парами основ ДНК, причому інтеркалююча молекула фіксується в спіралі  $\pi$ - $\pi$  та диполь-дипольними взаємодіями [6].

В усіх запропонованих моделях утворення комплексів ціанінових барвників з ДНК надається перевага механізму інтеркаляції [7—9]. Введення в структуру молекули барвника об'ємних замісників збільшує його розміри, що знижує здатність молекули інтеркалювати. Включення сильнополярних груп у структуру молекули також перешкоджає

інтеркаляції [10]. Тому, на наш погляд, не було сенсу застосовувати ці два шляхи пониження агрегації для підвищення чутливості методу.

У представленій роботі нами вивчався вплив полярності середовища на флюоресцентні властивості комплексів барвників з ДНК. Було досліджено монометинові ціанінові барвники ТО, властивості якого добре вивчені [11], та Суан 13, запропонований нами раніше [9]. Окрім того, для порівняння нами був використаний бромистий етидій, який не належить до класу монометинових ціанінових барвників і відомий як класичний інтеркалятор [12].

Для дослідження впливу пониження полярності середовища на спектрально-люмінесцентні властивості барвників та їхніх комплексів з ДНК ми використовували суміші 85 % буфера та 15 % органічного розчинника. Як видно з табл. 1, для обох досліджуваних ціанінів як у розчині чистого барвника, так і в присутності ДНК співвідношення  $D^{mol}/D^{ns}$  для розчину в буфері значно менше, ніж для аналогічного розчину в суміші буфер—органічний розчинник, а для деяких сумішей агрегаційна смуга взагалі практично зникає. З цього випливає, що кількість агрегатів у розчинах ціанінів та їхніх комплексів з ДНК дійсно значно зменшується. Разом з тим ми вважаємо, що використаний низький відсоток такої домішки суттєво не впливає на вторинну структуру ДНК.

Для розчинів вільних ТО та Суан 13 зменшення кількості агрегатів при пониженні полярності середовища супроводжувалося підвищенням інтенсивності флюоресценції в середньому в декілька разів (табл. 2). Ці результати добре узгоджуються з наведеними в літературі [4]. Навпаки, для комплексів барвник—ДНК, де також спостерігалось зменшення агрегаційної смуги, інтенсивність флюоресценції знизилася на 16—77 % для Суан 13 та на 13—58 % для ТО порівняно з буфером.

У спектрах поглинання бромистого етидію та його комплексів з ДНК агрегаційної смуги не спостерігається. При пониженні полярності середовища вільний бромистий етидій, як і ціаніни, збільшує (в 1,5—2 рази) інтенсивність власної флюоресценції (табл. 3).

Що ж стосується флюоресценції комплексів бромистий етидій—ДНК, то якісно результати аналогічні таким, що ми маємо для випадку ТО та Суан 13, тобто в присутності органічних розчинників інтенсивність флюоресценції зменшується. Але інтервал зміни інтенсивності флюоресценції комплексів барвник—ДНК при пониженні полярності середовища набагато ширший для ціанінів (16—77 % для Суан 13 та 13—58 % для ТО), ніж

для бромистого етидію (22—29 %). Разом з тим для комплексів барвник—ДНК у випадку бромистого етидію маємо максимальне зменшення інтенсивності флюоресценції менше ніж на третину, у випадку ТО — більше ніж удвічі, і у випадку Суан 13 — більше ніж у 4 рази.

Таким чином, можна зробити висновок, що для бромистого етидію зменшення інтенсивності флюоресценції комплексів барвник—ДНК у присутності органічних розчинників невелике і до того ж слабо залежить від природи домішки. Такий результат можна пояснити, спираючись на твердо встановлений факт про інтеркаляційний механізм взаємодії бромистого етидію з ДНК [12]. Оскільки молекула барвника, інтеркалювавши, знаходиться між парами основ ДНК, куди внаслідок гідрофобних взаємодій не потрапляють молекули середовища, то можна припустити, що за таких умов її контакт з молекулами органічного розчинника значно обмежений.

Навпаки, для ціанінів спостерігається значна залежність зменшення інтенсивності флюоресценції комплексів барвник—ДНК від природи присутніх органічних розчинників. На наш погляд, чисто інтеркаляційна модель взаємодії ціанінових барвників з ДНК не може цього пояснити. Ми вбачаємо два можливих пояснення, які могли б дати адекватне трактування отриманим результатам. З одного боку, можна припустити, що принаймні певна частина молекул барвника взаємодіє з ДНК не інтеркаляційним, а агрегаційним способом, будучи зафіксованими силами взаємодії в борозенці ДНК. При такому механізмі взаємодії з ДНК молекули барвника значно сильніше контактують з середовищем, ніж при інтеркаляції, що пояснює сильну залежність властивостей розчину від природи розчинника. Слід зазначити, що така модель пояснює отримані результати лише за умови, що підвищення квантового виходу молекули барвника при фіксації в борозенці ДНК є порівняним за величиною з аналогічним підвищенням при інтеркаляції. Друге можливе пояснення полягає в тому, що барвник взаємодіє з ДНК шляхом «напівінтеркаляції». Модель «напівінтеркаляції» була висунута нами недавно [5] і передбачає, що при взаємодії з ДНК один з гетероциклів барвника інтеркалює між парами основ ДНК, а інший розташований в борозенці. Отже, молекула барвника частково відкрита зовнішньому середовищу, що й пояснює вплив природи розчинника. Для того щоб з'ясувати, який з двох механізмів насправді реалізується, проаналізуємо результати досліджень флюоресценції ТО та Суан 13 у присутності полінуклеотидів, один з яких є послідовністю АТ-пар,

а другий — GC-пар нуклеотидних основ. Відомо, що загальна специфічність молекул, які взаємодіють з ДНК за різними механізмами, суттєво відрізняється. Борозенково взаємодіючі молекули демонструють значну перевагу при зв'язуванні з АТ-последовностями, тоді як для інтеркалюючих молекул спостерігається незначна перевага в тяжінні до GC-ділянок ДНК [13]. Таким чином, вивчення загальної специфічності зв'язування досліджуваних ціанинів могло б бути корисним для підтвердження того чи іншого з запропонованих механізмів взаємодії барвників. У результаті дослідження флюоресценції TO та Суан 13 у присутності полінуклеотидів було знайдено, що жоден з цих барвників не виявив суттєвої специфічності при взаємодії з полінуклеотидом poly(dA)·poly(dT). Однак у випадку реалізації «борозенкового» механізму взаємодії така специфічність повинна була б мати місце. Таким чином, ми вважаємо, що цей факт є додатковим свідченням на користь «напівінтеркаляційного» характеру взаємодії розглянутих ціанинових барвників з ДНК.

М. Ю. Лосицький, В. Б. Ковальская, С. Н. Ярмолук

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 9. Изучение спектральных свойств комплексов цианиновых красителей с ДНК в присутствии органических растворителей

Резюме

В работе исследовано влияние полярности среды на спектрально-люминесцентные свойства монометиновых цианиновых красителей и их комплексов с нуклеиновыми кислотами. Показано, что присутствие органического растворителя в водных растворах красителей и их комплексов с ДНК приводит к существенному уменьшению интенсивности флюоресценции комплексов краситель—ДНК и к возрастанию интенсивности собственной флюоресценции красителей. Интенсивность флюоресценции комплексов бромистый этидий—ДНК слабо зависит от конкретного органического растворителя, что может быть объяснено с учетом интеркаляционного механизма взаимодействия. Для цианиновых красителей, исследованных в работе, эта зависимость значительно более сильная, что свидетельствует о значительном контакте связанного с ДНК красителя с окружающей средой. Вместе с тем взаимодействие данных красителей с ДНК не обнаружило характерной для бороздкового взаимодействия специфичности к АТ-участкам. Таким образом, мы предположили, что исследованные в представленной работе цианиновые красители взаимодействуют с ДНК согласно механизму «полуинтеркаляции».

М. Yu. Losytsky, V. B. Kovalska, S. M. Yarmoluk

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 9. The study of spectral properties of cyanine dyes-DNA complexes in the presence of organic solvents

Summary

The influence of medium polarity on spectral-luminescent properties

of monomethyne cyanine dyes and their DNA-complexes has been studied in the presented work. The presence of organic solvent in aqueous dye and DNA-dye solutions resulted in significant decrease of DNA-dye complex fluorescence and increase of fluorescent intensity of free dyes. The fluorescence intensity of DNA-Ethidium bromide complexes depends weakly on the nature of the organic solvent. This result can be explained using the intercalary ion interaction model. But for the cyanine dyes, have been studied, this dependence is much stronger. So, the considerable contact to the medium of the cyanine dyes bound to DNA has been shown to exist. Nevertheless, the interaction of these dyes with DNA showed no reference to the AT-sequences. So, in this presentation work we assume the studied cyanine dyes to interact with the DNA according to «half-intercalation» mechanism.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rye H. S., Vue S., Wemmer D. E., Quesada M. A., Haugheand 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.— P. 2803—2812.
2. Skeidsvoll J., Ueland P. M. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR GREEN I // Anal. Biochem.—1995.—231.—P. 359—365.
3. Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K. DNA staining for fluorescent and laser confocal microscopy // J. Histochem. and Cytochem.—1997.—45, N 1.— P. 49—53.
4. Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Київ: Наук. думка, 1994, —170 с.
5. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Kovtun Yu. P. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 5. Towards model of «half intercalation» of monomethyne cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // Biopolimery i Kletka.—1999.—15, N 1.—P. 75—82.
6. Long E. C., Barton J. K. On demonstrating DNA intercalation // Accounts Chem. Res.—1990.—23, N 9.—P. 271—273.
7. Jacobsen J., Pedersen J., Hansen L., Wemmer D. Site selective bis-intercalation of homodimeric thiazole orange dye in DNA oligonucleotides // Nucl. Acids Res.—1995.—23.—P. 753—760.
8. Rye H., Glazer A. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA // Nucl. Acids Res.—1995.—23.— P. 1215—1222.
9. Yarmoluk S. M., Kovalska 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 // Biopolimery i Kletka.—1996.—12, N 6.—P. 74—81.
10. Yarmoluk S. M., Zhyvoloup A. N., Kovalska V. B., Klimenko I. V., Kukhareno O. P., Kovtun Yu. P., Slominsky Yu. L. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 1. Studies on monomethyne cyanine dyes as possible fluorescent probes for the detection of nucleic acids // Biopolimery i Kletka.—1996.—12, N 1.—P. 69—74.
11. Lee G., Chen C., Chiu L. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis // Cytometry.—1986.—7.—P. 508—517.
12. Waring M. Variations of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation // J. Mol. Biol.—1970.—54.— P. 247—279.
13. Neidle S. DNA structure and recognition / Ed. D. Reecwood.—New York: Oxford University press, 1994.—108 p.

УДК 542.95

Надійшла до редакції 13.07.98