

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 10. Синтез та спектральні властивості нових бензотіазоло-4-[2,6-диметилпіридинієвих] монометинових ціанінових барвників

Д. В. Криворотенко, В. Б. Ковальська, С. М. Ярмолюк

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

З метою розробки нових флюоресцентних ціанінових барвників для детекції нуклеїнових кислот одержано ряд нових похідних 2,6-диметил-4-(3-метил-3Н-бензотіазол-2-іліденметил)-1-алкіл-піридиній перхлорату. Досліджено спектрально-люмінесцентні властивості синтезованих барвників, їхніх комплексів з ДНК і РНК та в присутності білка. Вивчено вплив різноманітних функціональних груп у складі піридинієвих монометинових ціанінів на флюоресцентні властивості цих барвників та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами.

Вступ. Останнім часом монометинові ціаніни активно впроваджуються в біології, медицині та біоорганічній хімії як флюоресцентні барвники. Ряд властивостей робить їх виключно перспективними люмінофорами для детекції і мічення нуклеїнових кислот (НК): великі молярні коефіцієнти екстинкції ($> 50000 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$) у видимій області спектра; значні константи зв'язування з нуклеїновими кислотами поряд з неістотною спорідненістю до інших біополімерів та відсутністю специфічності у взаємодії з певним типом нуклеотидної послідовності [1].

Маючи слабку власну флюоресценцію, при взаємодії з нуклеїновими кислотами монометинові ціаніни підвищують інтенсивність флюоресценції в декілька сотень разів [2], що широко використовується для гомогенних систем детекції нуклеїнових кислот («фарбування» агарозних гелів [3], визначення НК в розчинах [4]).

Авторами роботи [5] у 1962 році синтезовано 4-[(1-метилбензотіазоліліден-2)-метил]-1,2,6-триметилпіридиніум (Суап 40) з використанням реакції 2-(2,6-диметил-піран-4-іліденметил)-3-ме-

тилбензотіазолій перхлорату (I) з метиламіном. Нами вперше було досліджено цей барвник як можливий флюоресцентний зонд для детекції нуклеїнових кислот та продемонстровано, що він має перспективні властивості для такого застосування [6].

Метою цієї роботи було вивчення реакції монометину (I) з первинними амінами, отримання структуроподібних до Суап 40 нових флюоресцентних барвників та розробка зручної методики проведення цієї реакції. В реакції з пірилієвим барвником (I) були використані аміни з різними функціональними групами, які, на наш погляд, можуть впливати на спектральні властивості отриманих барвників.

Матеріали і методи. *Матеріали.* Диметилформамід (ДМФА), метиловий спирт, етиловий спирт (95 %), хлороформ, триетиламін («Merck», Німеччина) використовували без попереднього очищення.

Етаноламін, ϵ -амінокапронова кислота, L-лізин, 3-амінопропанол, триптамін, 3,4-диметоксифенілетиламін, β -фенілетиламін, N,N-диметиламіністилендіамін, N, N'-діетиламіноетилендіамін; 2-(2-бензімідазоліл)-етиламін-1-(2-аміноетил)-пі-

перазин, трис(оксиметил)-амінометан гідрохлорид (трис) були отримані з «Aldrich» (США).

Для дослідження властивостей комплексів нуклеїнових кислот та білка з ціаніновими барвниками використано ДНК з тимусу бика, тотальну дріжджову РНК, альбумін з сироватки бика (БСА), отримані з «Sigma» (США).

Для тонкошарової хроматографії використовували пластинки «Silufol» (Чехія) в системах хлороформ : метанол : триетиламін (4 : 2 : 1) (А), (4 : 3 : 1) (В), (3 : 3 : 1) (С).

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання одержано з використанням спектрофотометра Spectord M-40 (Німеччина) одразу ж після приготування розчинів барвників та їхніх комплексів з НК у відповідних розчинниках: у буфері (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5) або ДМФА.

Реєстрацію спектрів флюоресценції здійснювали за допомогою 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 ¹Н отримували на приладі «Varian» (300 МГц) з внутрішнім стандартом ТМС.

Приготування стокових розчинів нуклеїнових кислот, барвників. Стокові розчини барвників (2 · 10⁻³ М) готували розчиненням точної наважки барвників у ДМФА. В цьому розчиннику вони були стабільними протягом декількох місяців на противагу водним розчинам, де з часом спостерігалася різка втрата флюоресцентних властивостей. Стокові розчини нуклеїнових кислот готували розчиненням наважки відповідних біополімерів у буфері трис-НСІ, 50 мМ, рН 7,5, їхні концентрації становили 6,1 · 10⁻³ М пар основ для ДНК і 1,2 · 10⁻² М основ для РНК. Концентрації ДНК та РНК були уточнені за допомогою спектрів поглинання в УФ області.

Приготування робочих розчинів. Робочі розчини барвників та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами готували безпосередньо перед вимірюванням. Для цього стокові розчини барвника та НК розводили у трис-НСІ (50 мМ, рН 7,5) буфері. Остаточні концентрації барвників, ДНК та РНК дорівнювали 2,0 · 10⁻⁵ М; 1,2 · 10⁻⁴ М пар основ та 2,4 · 10⁻⁴ М основ відповідно. Таким чином, співвідношення в комплексах барвник—нуклеїнова кислота становило одна молекула барвника на 12 основ для РНК і на 6 пар основ для ДНК. Використовували робочі розчини білка з концентрацією 1 мг/мл.

Загальна методика синтезу барвників. До на-

важки пірилієвого барвника (I) 0,75 ммоль (0,277 г) додали 5 мл ДМФА та 1 ммоль первинного аміну. Суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 10 хв. Потім випаровували розчинник під зниженим тиском та додавали 5 мл спирту, фільтрували і промивали на фільтрі спиртом та водою. Синтезовані піридинієві монометинові ціаніни мали загальну формулу (рис. 1).

При описанні спектрів ПМР використані такі скорочення: с. — синглет; д. — дублет; т. — триплет; кв. — кватрет; квінт. — квінтет; м. — мультиплет; уш. м. — уширений мультиплет; уш. т. — уширений триплет.

2-({1-[2-(1Н-бензо[d]імідазол-2-іл)етил]-2,6-диметил-1,4-дихлоро-4-піридиніліден}-метил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат (D-1); вихід 91 %; Т_т = 220—221 ° С з розкл.; R_f = 0,67 (А); ПМР (ДМСО d₆) δ: 2,68 (с., 6Н, 2СН₃) 3,37 (т., 2Н, J = 6,9 Гц, -СН₂-) 3,69 (с., 3Н, N-СН₃) 4,67 (т., 2Н, J = 7,1 Гц, N-СН₂-) 6,03 (с., 1Н, =СН-) 7,07 (с., 1Н, ароматичний протон) 7,20 (м., 4Н, ароматичні протони) 7,49 (м., 4Н, ароматичні протони) 7,83 (т., 1Н, J = 6,9 Гц, ароматичний протон).

2-{{1-(3,4-диметоксифенетил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридинілід-ен]-метил}-3-метил-1,3-

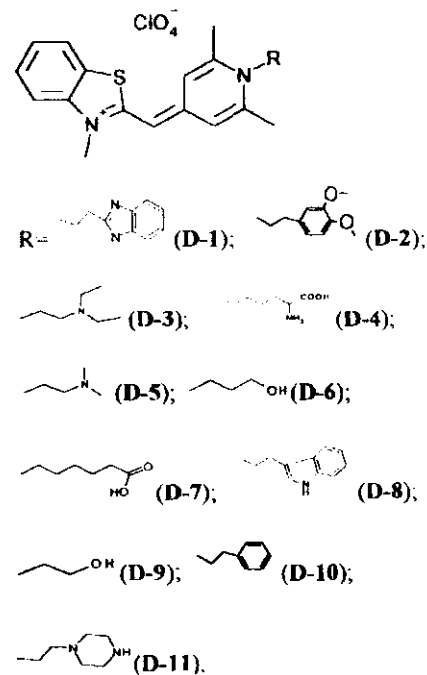


Рис. 1. Синтезовані монометинові піридинієві ціаніни

бензотіазол-3-ій перхлорат (D-2); вихід 94 %; $T_m = 246-247^\circ\text{C}$ з розкл.; $R_f = 0,83$ (A); ПМР (ДМСО d_6) δ : 2,63 (с., 6H, 2CH₃) 3,02 (т., 2H, J = 6,9 Гц,) 3,70 (с., 6H, 2-OCH₃) 3,73 (с., 3H, N-CH₃) 4,40 (т., 2H, J = 7,2 Гц, N-CH₂-) 6,05 (с., 1H, =CH-) 6,81 (м., 2H, ароматичні протони) 6,91 (д., 1H, J = 7,5 Гц, ароматичний протон) 7,23 (с., 2H, =CH-) 7,29 (т., 1H, J = 7,8 Гц, ароматичний протон) 7,55 (м., 2H, ароматичні протони) 7,86 (д., 1H, J = 7,8 Гц, ароматичний протон).

N, N-діетил-2-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-2-іл)-метиле]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-1-аміноетан перхлорат (D-3); вихід 95 %; $T_m = 223-224^\circ\text{C}$; $R_f = 0,79$ (B); ПМР (CDCl₃) δ : 0,88 (т., 6H, J = 8,3 Гц, N(CH₂CH₃)₂) 2,52 (кв., 4H, J = 8,2 Гц, N(CH₂CH₃)₂) 2,72 (м., 8H, 2CH₃ + CH₂N(C₂H₅)₂) 3,69 (с., 3H, N-CH₃) 4,28 (т., 2H, J = 7,3 Гц, N-CH₂-) 6,05 (с., 1H, =CH-) 7,24 (с., 2H, 2=CH-) 7,28 (т., 1H, J = 7,3 Гц, ароматичний протон) 7,55 (м., 2H, ароматичні протони) 7,86 (д., 1H, J = 7,7 Гц, ароматичний протон).

2-аміно-6-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-2-іл)-метиле]-1,4-дигідро-1-піридиніл} гексанова кислота перхлорат (D-4); вихід 93 %; $T_m = 229-230^\circ\text{C}$; $R_f = 0,05$ (C); ПМР (ДМСО d_6) δ : 1,51 (уш. м., 2H, -CH₂-) 1,73 (уш. м., 4H, -CH₂CH₂-) 3,20 (уш. м., 1H, CH) 3,67 (с., 3H, N-CH₃) 4,16 (уш. т., 2H, N-CH₂-) 6,03 (с., 1H, =CH-) 6,68 (с., 6H, 2CH₃) 7,22 (с., 2H, 2=CH-) 7,26 (т., 1H, J = 7,2 Гц, ароматичний протон) 7,51 (м., 2H, ароматичні протони) 7,82 (д., 1H, J = 7,5 Гц, ароматичний протон).

N, N-диметил-2-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-2-іл)-метиле]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-1-аміноетан перхлорат (D-5); вихід 95 %; $T_m = 226-227^\circ\text{C}$; $R_f = 0,11$ (C); ПМР (ДМСО d_6) δ : 2,25 (с., 6H, N(CH₃)₂) 2,65 (т., 2H, J = 7,3 Гц, -CH₂N(CH₃)₂) 2,70 (с., 6H, 2CH₃) 6,69 (с., 3H, N-CH₃) 6,04 (с., 1H, =CH-) 7,22 (с., 2H, 2=CH-) 7,28 (т., 1H, J = 7,2 Гц, ароматичний протон) 7,54 (м., 2H, ароматичні протони) 7,85 (д., 1H, J = 7,8 Гц, ароматичний протон).

3-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-2-іл)-метиле]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-1-пропанол перхлорат (D-6); вихід (92 %); $T_m = 246-247^\circ\text{C}$ з розкл.; $R_f = 0,68$ (A); ПМР (ДМСО d_6) δ : 1,88 (уш. м., 2H, -CH₂CH₂CH₂-) 2,69 (с., 6H, 2CH₃) 3,55 (уш. м., 2H, -CH₂OH) 3,68 (с., 3H, N-CH₃) 4,28 (т., 2H, J = 6,9 Гц, N-CH₂-) 4,81 (уш. т., 1H, -OH) 6,03 (с., 1H, =CH-) 7,23 (с., 2H, 2=CH-) 7,27 (т., 1H, J = 7,8 Гц, ароматичний протон) 7,53 (м., 2H, ароматичні протони) 7,87 (д., 1H, J = 7,2 Гц, ароматичний протон).

6-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-2-іл)-метиле]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-гексанова кислота перхлорат (D-7); вихід 88 %; $T_m = 219-220^\circ\text{C}$ з розкл.; $R_f = 0,69$ (A); ПМР (ДМСО d_6) δ : 1,43 (квінт., 2H, J = 7,2 Гц, -CH₂-) 1,60 (квінт., 2H, J = 7,2 Гц, -CH₂-) 1,72 (квінт., 2H, J = 7,1 Гц, -CH₂-) 2,25 (т., 1H, J = 7,3 Гц, -CH₂-COOH) 2,67 (с., 6H, 2CH₃) 3,67 (с., 3H, N-CH₃) 4,16 (т., 2H, J = 6,8 Гц, N-CH₂-) 6,02 (с., 1H, =CH-) 7,19 (с., 2H, 2=CH-) 7,26 (т., 1H, J = 7,2 Гц, ароматичний протон) 7,50 (м., 2H, ароматичні протони) 7,83 (д., 1H, J = 7,8 Гц, ароматичний протон).

D-1,2-({1-[2-(1H-3-індоліл)-етил]-2, 6-диметил-1,4-дихлоро-4-піридин-іліден}-метил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат (D-8); вихід після перекристалізації з ДМФА 78 %; $T_m = 289-290^\circ\text{C}$ з розкл.; $R_f = 0,33$ (A); ПМР (ДМСО d_6) δ : 2,66 (с., 6H, 2CH₃) 3,218 (т., 2H, J = 7,0 Гц, -CH₂-) 3,65 (с., 3H, N-CH₃) 4,45 (т., 2H, J = 7,2 Гц, N-CH₂-) 6,05 (с., 1H, =CH-) 7,01 (т., 1H, J = 6,9 Гц, ароматичний протон) 7,10 (т., 1H, J = 7,0 Гц, ароматичний протон) 7,21 (м., 4H, ароматичні протони) 7,38 (д., 1H, J = 7,5 Гц, ароматичний протон) 7,54 (м., 3H, ароматичні протони) 7,85 (д., 1H, J = 7,8 Гц, ароматичний протон) 10,98 (с., 1H, NH).

2-{2,6-диметил-4-[(3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-2-іл)-метиле]-1,4-дигідро-1-піридиніл}-етанол перхлорат (D-9); вихід 90 %; $T_m = 281-282^\circ\text{C}$ з розкл.; $R_f = 0,18$ (A); ПМР (ДМСО d_6) δ : 2,68 (с., 6H, 2CH₃) 3,67 (с., 3H, N-CH₃) 3,79 (кв., 2H, J = 7,1 Гц, -CH₂OH) 4,34 (т., 2H, J = 6,9 Гц, N-CH₂-) 5,25 (т., 1H, J = 7,4 Гц, -OH) 6,02 (с., 1H, =CH-) 7,20 (с., 2H, 2=CH-) 7,27 (т., 1H, J = 7,2 Гц, ароматичний протон) 7,53 (м., 2H, ароматичні протони) 7,86 (д., 1H, J = 7,8 Гц, ароматичний протон).

2-{(диметил-1-фенетил-1,4-дигідро-4-піридин-іліден)-метил}-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат (D-10); вихід 96 %; $T_m = 285-287^\circ\text{C}$ з розкл.; $R_f = 0,79$ (A); ПМР (ДМСО d_6) δ : 2,67 (с., 6H, 2CH₃) 3,10 (т., 2H, J = 6,9 Гц, -CH₂-) 3,70 (с., 3H, N-CH₃) 4,41 (м., 2H, J = 7,1 Гц, N-CH₂-) 6,05 (с., 1H, =CH-) 7,23 (с., 2H, 2=CH-) 7,32 (м., 6H, ароматичні протони) 7,56 (м., 2H, ароматичні протони) 7,87 (д., 1H, J = 7,8 Гц).

2-{{2,6-диметил-1-(2-піперазиноетил)-1,4-дигідро-4-піридиніліден}-метил}-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат (D-11); вихід 86 %; $T_m = 252-253^\circ\text{C}$; $R_f = 0,09$ (C); ПМР (ДМСО d_6) δ : 2,70 (уш. м., 10H, 2CH₃ + 2-CH₂-) 2,71 (т., 2H, J = 7,3 Гц, -CH₂-) 3,11 (уш. м., 4H, 2-CH₂-) 3,69 (с., 3H, N-CH₃) 4,31 (т., 2H, J = 6,9 Гц, N-CH₂-) 6,04

(с., 1Н, =СН-) 7,22 (с., 2Н, 2=СН-) 7,29 (т., 1Н, $J = 7,3$ Гц, ароматичний протон) 7,55 (м., 2Н, ароматичні протони) 7,86 (д., 1Н, $J = 7,8$ Гц, ароматичний протон).

Результати. Порівняльні характеристики спектрів поглинання та флюоресценції ціанінових барвників в ДМФА та водному буфері, а також їхні хімічні структури подані в табл. 1.

Максимуми поглинання піридинієвих барвників (λ_{mol}) у малополярному ДМФА розташовані в інтервалі 440—448 нм і при переході до полярного водного буфера незначно зсуваються в короткохвильовий бік на 2—10 нм. Максимум поглинання для барвника ТО, який використовувався у дослідженнях для порівняння, в ДМФА розташований на 505 нм, при переході до водного буфера зсувається в короткохвильовий бік на 5 нм.

Максимуми флюоресценції вільних піридинієвих барвників знаходяться в інтервалі 478—488 нм (λ_{em}). Їхні стоксові зсуви (ΔS) лежать у межах 42—50 нм, барвники мають невелику власну флюоресценцію ($I_0^{\text{flu}} = 0,28—0,46$). Інтенсивність випромінювання вільного ТО є дуже низькою та знаходиться на рівні фону, чіткий максимум флюоресценції відсутній.

Спектральні характеристики комплексів барвників з НК наведені в табл. 2.

Максимуми поглинання піридинієвих барвників у комплексах з ДНК та РНК розташовані на

435—452 нм, для комплексів ТО ці максимуми знаходяться на 505 нм. Для барвників D-1, 2, 3, 8 відповідні максимуми зсуваються в короткохвильовий бік на 1—5 нм відносно максимумів вільних барвників. Максимуми поглинання комплексів барвників D-5, 9, 10, 11, Суан 40 і ТО зсунуті в довгохвильовий бік відносно піків незв'язаних барвників на 1—9 нм. Максимуми випромінювання комплексів барвників з нуклеїновими кислотами знаходяться в межах 483—495 нм, окрім ТО (540—545 нм). Комплекси барвників з ДНК та РНК мають середні стоксові зсуви 35—54 нм. Інтенсивність флюоресценції (I^{flu}) комплексів барвників з нуклеїновими кислотами лежить в інтервалі 23,7—59,2 в. о. (відносні одиниці) для ДНК та 30—112 в. о. для РНК. Величина зростання інтенсивності флюоресценції (ΔQ) є відношенням інтенсивності випромінювання барвника в комплексі до інтенсивності випромінювання чистого барвника ($I^{\text{flu}}/I_0^{\text{flu}}$). Для комплексів піридинієвих ціанінів ця величина знаходиться в межах 64,5—168,6 для ДНК та 72—256 для РНК. Для ТО це збільшення дорівнює 1481 та 2400 відповідно.

Спектральні характеристики ціанінових барвників у присутності білка наведені в табл. 3.

Наявність білка в робочих розчинах практично не впливає на розташування максимумів поглинання барвників (λ_{max}), що знаходяться на 435—447 нм для піридинієвих ціанінів і на 500 нм для ТО.

Таблиця 1
Спектрально-люмінесцентні характеристики ціанінових барвників

N	ДМФА λ_{mol} , нм	Буфер λ_{mol} , нм	$\Delta\lambda$, нм	$\Delta\lambda_{\text{em}}$, нм	I_0^{flu}	ΔS , нм
D-1	448	438	10	488	0,415	50
D-2	447	444	3	486	0,46	42
D-3	446	443	3	488	0,382	45
D-4	444	440	4	485	0,338	45
D-5	446	443	3	486	0,403	43
D-6	444	442	2	485	0,46	43
D-7	444	438	6	480	0,43	42
D-8	446	443	3	485	0,437	42
D-9	444	441	3	479	0,4	38
D-10	446	442	4	478	0,39	36
D-11	446	443	5	486	0,28	43
Суан40	440	435	5	480	0,298	45
ТО	505	500	5	—*	0,016	—

*Власна флюоресценція барвника знаходиться на рівні фону, чіткого максимуму випромінювання не спостерігається.

Таблиця 2

Спектральні характеристики комплексів ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами

N	ДНК					РНК				
	λ_{abs} , нм	λ_{em} , нм	ΔS , нм	I , в. о.	ΔQ , в. о.	λ_{abs} , нм	λ_{em} , нм	ΔS , нм	I , в. о.	ΔQ , в. о.
D-1	435	488	53	35	84,3	436	490	54	30	72,3
D-2	444	488	44	31,9	69	443	490	47	40	86,9
D-3	444	495	51	32,5	85	443	495	52	51,4	134,5
D-4	440	485	45	57	168,6	440	488	48	40,5	119,8
D-5	444	493	49	26	64,5	444	494	50	78	193,5
D-6	442	488	46	59,17	128,6	442	488	46	47,8	103,9
D-7	438	485	47	34	79	438	483	45	38	88,4
D-8	443	488	45	47	107,5	438	488	50	112	256,3
D-9	445	483	38	55	137,5	443	484	41	40,4	101
D-10	447	482	35	26,8	68,7	444	483	41	29,8	76,4
D-11	452	490	380	42	150	450	490	40	55	196,4
Суан40	440	490	50	42	140,9	436	494	51	51	171,7
ТО	505	540	35	23,7	1481	505	545	40	38,4	2400

Таблиця 3

Спектральні характеристики барвників в присутності білка

N	БСА					
	λ_{abs} , нм	$\Delta\lambda$, нм	λ_{em} , нм	ΔS , нм	I , в. о.	ΔQ (I/I_0), в. о.
D-1	438	—	484	46	4,37	10,5
D-2	445	1	487	42	5,67	12,3
D-3	443	—	488	45	1,546	4
D-4	440	—	486	46	2,58	7,6
D-5	447	4	491	45	2,8	6,9
D-6	442	—	485	43	2,56	5,5
D-7	439	1	480	41	2,8	6,5
D-8	446	3	487	41	17,2	39
D-9	441	—	486	45	2,32	5,8
D-10	443	1	489	46	2,38	6,1
D-11	444	1	493	49	0,85	3
Суан 40	435	—	478	43	2,16	7,2
ТО	500	—	550	50	0,36	22,5

Різниця між максимумами поглинання барвників у буфері та в присутності білка ($\Delta\lambda$) дорівнює 1—4 нм. Максимуми випромінювання (λ_{em}) піридинових барвників та ТО розташовані відповідно на

478—492 та 550 нм. Стоксові зсуви (ΔS) ціанінів у присутності білка заходяться в межах 41—50 нм.

Інтенсивність випромінювання (I^{flu}) і зростання інтенсивності флуоресценції барвників (ΔQ) у при-

сутності білка є досить невеликими. Найбільше зростання випромінювання (у 39 разів) спостерігається для барвника D-8, інші піридинієві ціаніни в присутності білка збільшують свою флюоресценцію у 3—12,3 разу. Квантовий вихід флюоресценції для ТО зростає у 22,6 разу.

Обговорення результатів. Загальновідомо, що солі пірилію легко взаємодіють з амінами та аміаком з утворенням похідних піридину. Механізм цієї реакції полягає в нуклеофільній атаці пірилієвого циклу аміаком чи аміном з подальшим замиканням піридинового кільця (рис. 2) [7].

Дослідження цієї реакції довели, що при нагріванні одного еквіваленту перхлорату триметилпірилію з двома еквівалентами первинного ароматичного аміну в воді чи спирті протягом однієї години з добрими виходами були отримані N-арилпіридинієві солі. З первинними амінами, які не мають замісників біля α -вуглецевого атома, реакція проходить при такому ж співвідношенні реагентів у водному розчині при короткочасному кип'ятінні з отриманням гарного виходу N-алкілпіридинієвих солей [8].

Барвник (I) в одній з таутомерних структур являє собою пірилієву сіль, для якої характерною є реакція з первинними амінами. Раніше було показано, що з ароматичним аміном вона проходить у жорстких умовах (нагрівання до 195 °C у великому надлишку аніліна протягом 20 хв). Зі спиртовим

розчином метиламіну (I) реагує досить легко при нагріванні в нітрометані [5] (рис. 3).

Нами вперше досліджено реакцію (I) з первинними амінами, що мають як замісники різні функціональні групи, та розроблено зручну загальну методику її проведення. Барвник (I) взаємодіє з невеликим надлишком аміну при короткочасному нагріванні в ДМФА з отриманням доброго виходу N-алкілпіридинієвої солі (рис. 1). Взаємодії не заважає наявність у молекулі аміну карбоксильної (D-7), спиртової (D-6, D-9), вторинної аміногрупи (D-11), діалкіламіногрупи (D-3, D-5), бензімідазольного (D-1) та індольного (D-8) циклів. Використовуючи цю методику, ми отримали ряд нових сполук. Індивідуальність отриманих речовин була підтверджена хроматографічно, електронними спектрами та спектрами ПМР.

Амінокислоти реагують з солями пірилію подібно до первинних амінів, але з деякими відмінностями. Конденсація амінокислот практично будь-якої будови та деяких пептидів з перхлоратом 2,4,6-триметилпірилію проходить при короткочасному кип'ятінні еквімолярної кількості компонентів в оцтовій кислоті з отриманням бетаїнових похідних, які при обробці HClO_4 перетворюються на четвертинні солі нормальної будови [9].

З ефірами амінокислот реакція легко проходить при нагріванні солі пірилію в спирті. При проведенні реакції в таких умовах з діамінокис-

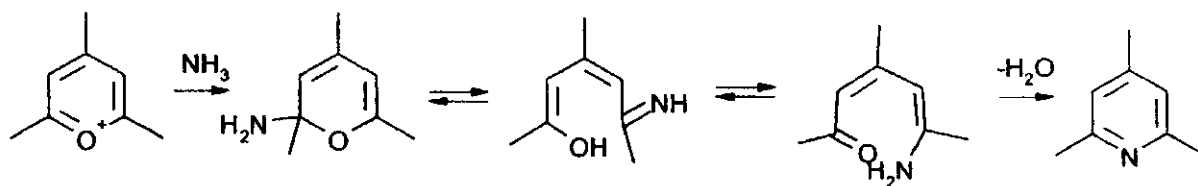
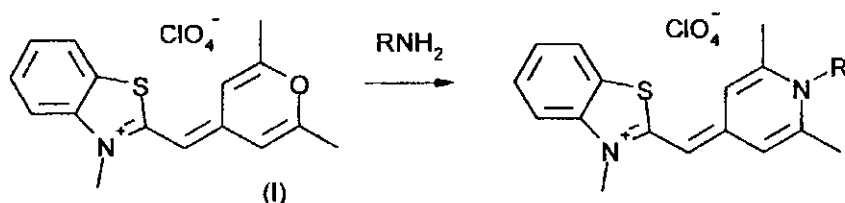


Рис. 2. Механізм реакції пірилієвої солі з аміаком



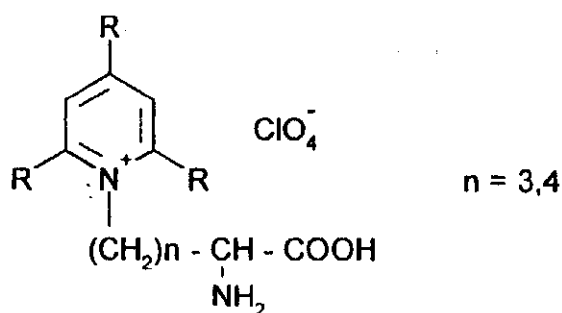


Рис. 4. Продукти реакції солей пірилію з діамінокислотами

лотами (лізин, орнітин) реагують виключно δ - та ϵ -аміногрупи з отриманням піридинієвих солей [10] (рис. 4).

В умовах запропонованої нами методики (I) не реагує з α -амінокислотами. З 2,6-діаміногексановою кислотою (лізином) (I) взаємодіє виключно по λ -аміногрупі подібно до інших солей пірилію (рис. 1, D-4). Внаслідок існування двох таутомерних форм (I), на нашу думку, має меншу реакційну здатність та більшу чутливість до стеричних утруднень порівняно з сіллю 2,4,6-триметилпірилію.

Раніше нами було продемонстровано, що монометиновий барвник Суап 40 є досить перспективним як флюоресцентний зонд для детекції нуклеїнових кислот [6]. У даній роботі ми досліджували вплив різноманітних функціональних груп у складі структурно подібних до Суап 40 ціанінів на флюоресцентні властивості цих барвників та їхніх комплексів з НК.

Згідно з інтеркаляційними моделями, що описують взаємодію ціанінів з двоспіральною ДНК, функціональний залишок, присутній в структурі барвника, розміщується у маленькій борозенці [11]. Тому наявність функціональної групи в молекулі барвника, на наш погляд, повинна впливати на утворення комплексів з нуклеїновими кислотами та на їхні властивості.

Введення функціонального залишку в структуру барвника призводить до підвищення власної флюоресценції піридинієвих ціанінів відносно Суап 40 в усіх випадках, окрім D-11.

Для ціанінів, досліджених у даній роботі, зростання інтенсивності флюоресценції (ΔQ) у комплексах з РНК є більшим, ніж у комплексах з ДНК. Навпаки, для барвників D-1 та D-4, в структурі яких присутні відповідно бензімідазолний цикл та залишок лізіну, спостерігається зворотна залежність (табл. 1, 2).

Нами показано, що введення спиртової групи та залишку лізіну до структури ціанінів (D-4, D-6, D-9) спричинює зростання флюоресценції комплексу з ДНК та зменшення інтенсивності випромінювання в комплексі барвник—РНК відносно ціаніну Суап 40 (табл. 2).

Присутність фрагментів, що містять аміногрупи (D-5, D-11), підвищує флюоресценцію комплексів барвника з РНК та понижує або не впливає на інтенсивність випромінювання в присутності ДНК відносно Суап 40. Але для барвника D-3, що містить діетиламіноетильний фрагмент, такого збільшення не спостерігається (табл. 2).

Ціанін D-8, у структурі якого присутній триптаміновий залишок, у комплексах з НК має вищу інтенсивність випромінювання, ніж Суап 40. У присутності білка рівень флюоресценції цього барвника також є найвищим серед досліджених ціанінів (табл. 2, 3).

При введенні до структури барвника піперазинового фрагмента (D-11) спостерігається зниження рівня власної флюоресценції, в той час як інтенсивність випромінювання комплексів з нуклеїновими кислотами для D-11 знаходиться приблизно на тому ж рівні, що й для Суап 40. Таким чином, ΔQ для комплексів D-11 з нуклеїновими кислотами є вищим, ніж для Суап 40. Рівень флюоресценції цього ціаніну в присутності білка найнижчий серед досліджуваних барвників (табл. 1—3).

Узагальнюючи, можна зазначити, що наявність гідроксильної групи та залишку лізіну в структурі ціанінів покращує флюоресцентні властивості комплексу барвника з ДНК, а наявність аміногрупи — комплексу з РНК. Введення ароматичних замісників, за винятком триптофану, та інших фрагментів, які були використані при конструюванні барвників, погіршували властивості ціанінів як флюоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот порівняно з Суап 40.

Д. В. Криворотенко, В. Б. Ковальская, С. Н. Ярмолюк

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 10. Синтез и спектральные свойства новых бензотиазоло-4-[2,6-диметилпиридиниевых] монометиновых цианиновых красителей

Резюме

Для разработки новых флюоресцентных цианиновых красителей при детекции нуклеиновых кислот получен ряд новых производных 2,6-диметил-4-(3-метил-3Н-бензотиазол-2-илиденметил)-1-алкил-пиридиний перхлората. Исследованы спектрально-люминесцентные свойства синтезированных красителей, их комплексов с ДНК и РНК, а также в присутствии белка. Изучено влияние различных функциональных групп в составе пиридиниевых монометиновых цианинов на флюорес-

центные свойства этих красителей и их комплексов с нуклеиновыми кислотами.

D. V. Krivorotenko, V. B. Kovalska, S. M. Yarmoluk

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 10. Synthesis and spectral properties of novel benzothiazol-4-[2,6-dimethylpyridinium] monomethyne cyanine dyes

Summary

A number of new derivatives of 2,6-dimethyl-4-(3-methyl-3H-benzothiazol-2-ylidene)-1-alkyl-pyridinium perchlorate have been synthesized to develop novel fluorescent dyes for the nucleic acids detection. Spectral properties of the synthesized dyes, their complexes with nucleic acids and also in the presence of protein have been studied. The influence of different functional groups on fluorescent properties of the novel cyanine dyes and their nucleic acids complexes have been investigated.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Haugland R. P. Molecular probes: Handbook of fluorescent probes and research chemicals // Molecular Probes.—Eugene: OR Inc., 1996.—679 p.
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.—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., Dabora, J. M., Quesada M. A., Mathies R. A., Glazer A. N. Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity // Anal. Biochem.—1993.—208.—P. 144—150.
5. Kelemen J., Wizinger R. λ Ber alkylsubstituierte Pyrylo- and Pyridino-Cyanine I 2,6-Dimethylpyrylo- und 2,6-Dimethylpyridino-Cyanine aus 2,6-Dimethyl- λ -pyron // Helv. Chim. acta.—1962.—45.—P. 1908—1917.
6. Yarmoluk S., Kovalska V, Kovtun Y. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 5. Towards model of «half intercalation» of monomethyne cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // Biopolimery i Kietka.—1999.—15, N 1.—P. 75—82.
7. Бельский И. Ф., Дорофенко Г. М., Простаков Н. С., Шерстюк В. П. Гетероциклы в органическом синтезе.—Киев: Техника, 1970.
8. Balaban A. T., Toma C. Reactions of pyrylium salts with nucleophiles-IV. Isolation of an intermediate in the conversion of 2,4,6-triphenylpyrylium perchlorate into 2,4,6-triphenylpyridine by ammonia // Tetrahedron.—1966.—22, Suppl. 7.—P. 9—27.
9. Наркевич А. Н., Дорофеев Г. Н., Жданов Ю. А. Конденсация перхлората 2, 4, 6-триметилпирилия с аминокислотами и пептидами // Докл. АН СССР.—1967.—176, № 1.—С. 103—106.
10. Жданов Ю. А., Дорофеев Г. Н., Наркевич А. Н. Синтез природных соединений, их аналогов и фрагментов.—М.: Наука, 1965.—160 с.
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.

УДК 542.95

Надійшла до редакції 07.09.98