

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 16. Нові флюоресцентні бензотіазоло-4-[2,6-диметилпіридинієві] монометинові ціанінові барвники

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

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

Синтезовано нові флюоресцентні зонди для детекції нуклеїнових кислот на основі 2-[1-(5-карбоксіпентил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорату. Досліджено спектральні властивості отриманих сполук та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами. Вивчено вплив функціональних замісників у молекулі барвника на його взаємодію з нуклеїновими кислотами. Отримані результати показали, що введення спиртових груп та акридинового фрагмента до молекули ціаніну покращує його властивості як флюоресцентного зонда для детекції нуклеїнових кислот.

Вступ. Детекція нуклеїнових кислот за допомогою флюоресцентних барвників має широке практичне та наукове застосування в біології та медицині. Монометинові ціанінові барвники [1] належать до найчутливіших флюоресцентних зондів і є перспективним класом для пошуку нових флюорофорів.

У попередніх роботах нами вперше було запропоновано барвник 4-[(1-метилбензотіазоліліден-2)-метил]-1,2,6-триметилпіридиній (Суап 40) як флюоресцентний зонд для детекції нуклеїнових кислот [2] та синтезовано ряд його похідних з різними N-алкільними радикалами в піридинієвому кільці [3]. Дослідження спектральних властивостей отриманих барвників показали, що порівняно з вихідним барвником Суап 40 наявність гідроксильної групи в структурі ціанінів покращує флюоресцентні властивості комплексу барвника з ДНК, а наявність аміногрупи — комплексу з РНК [3].

Метою даної роботи було продовження синтезу нових флюоресцентних зондів на основі 2-[1-(5-карбоксіпентил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорату (I), а також дослідження фізико-хімічних

властивостей синтезованих ціанінів та вивчення впливу природи зонда на його взаємодію з нуклеїновими кислотами.

Матеріали і методи. *Матеріали.* В роботі використували сухий перегнаний під зниженим тиском диметилформамід (ДМФА) («Merck», Німеччина), етиловий спирт (95 %) (Україна).

Дициклогексилкарбодіїмід (ДЦК), карбонілдіімідазол (КДІ), гідроксибензотріазол, триетиламін, триптамін, 1,4-діамінобензол, 9-аміноакридин, N,N-диметиламіноетилендіамін, N,N-діетиламіноетилендіамін; *трис*-(оксиметил)-амінометан гідрохлорид були отримані з «Aldrich» (США).

Барвники D-20, D-6, D-9 (рис. 1) та 2-[1-(5-карбоксіпентил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат (I) були синтезовані згідно з [3].

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

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання записували з використанням спектрофотометра Specord M-40 (Німеччина) одразу ж після приготування розчинів барвників та їхніх комплексів з

© Д. В. КРИВОРОТЕНКО, В. Б. КОВАЛЬСЬКА, С. М. ЯРМОЛЮК, 2000

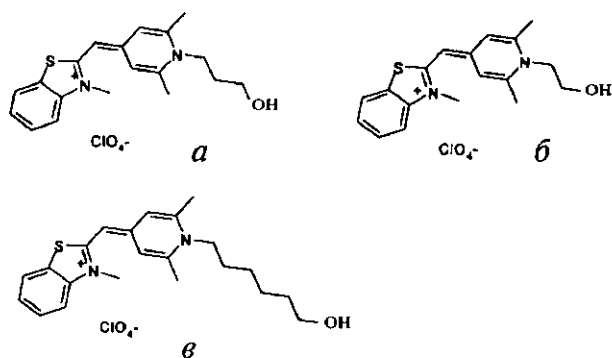


Рис. 1. Структури барвників D-6 (а), D-9 (б) та D-20 (в)

нуклеїновими кислотами у відповідних розчинниках — буфері (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5) або ДМФА.

Для реєстрації спектрів флюоресценції використовували флюоресцентний спектрофотометр Hitachi Model 850 (Японія). Флюоресцентні виміри здійснювали у кварцевій кюветі (0,5 × 0,5 см). Спектри ЯМР Н¹ 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 останніх у ДМФА. В цьому розчиннику вони були стабільними протягом декількох місяців на противагу водним розчинам, де з часом спостерігалася значна втрата їхніх 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.

Приготування робочих розчинів. Робочі розчини барвників та їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами готували безпосередньо перед вимірюванням розведенням стокових розчинів барвника та нуклеїнових кислот у буфері (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5). Остаточна концентрація барвників, ДНК та РНК дорівнювала відповідно 2 · 10⁻⁵ М; 1,2 · 10⁻⁴ М пар основ та 2,4 · 10⁻⁴ М основ. Таким чином, співвідношення в комплексах барвник—нуклеїнова кислота становило одна молекула барвника до 12 основ для РНК та до 6 пар основ для ДНК.

Загальна методика синтезу барвників (рис. 2). До суспензії 0,241 г (0,5 мМ) барвника (I) в 1 мл

ДМФА при температурі 40 °С додавали 0,089 г (0,55 мМ) КДІ. Через 5 хв вливали розчин (0,5 мМ) аміну в ДМФА та суміш залишали на годину у випадку аліфатичного аміну чи на добу у випадку ароматичного аміну. Суміш випаровували під зниженим тиском, залишок кристалізували з етанолу.

Синтез барвника D-17. До 7 мл ДМФА при температурі 0 °С додавали 0,241 г (0,5 мМ) барвника (I), 0,097 г (0,5 мМ) 9-аміноакридину, 0,206 г (1 мМ) ДЦК, 0,068 г (0,5 мМ) гідроксибензотріазолу та суміш перемішували при цій же температурі протягом 24 год. Розчин підігрівали до кімнатної температури та фільтрували. Фільтрат випаровували під зниженим тиском, залишок кристалізували з етанолу.

Дані ПМР спектрів синтезованих барвників. При описанні ПМР спектрів використано такі скорочення: с. — синглет; д. — дублет; д. д. — дублет дублетів; т. — триплет; кв. — квінтет; м. — мультиплет; уш. с. — уширений синглет.

D-16: 2-(1-{5-[2-(1Н-3-індоліл)-етилкарбамоїл]-пентил}-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліден-метил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат. Вихід 0,271 г (87 %); Т_г = 210—212 °С. ПМР (ДМСО-d₆) δ: 1,39 (2Н, м., СН₂СН₂СН₂СО); 1,59 (2Н, кв., j = 6,9 Гц, СН₂СН₂СО); 1,71 (2Н, м., NСН₂СН₂); 2,10 (2Н, т., j = 6,8 Гц, NНСН₂СН₂); 2,60 (6Н, с., 2СН₃); 2,80 (2Н, т., j = 6,8 Гц, СН₂СО); 3,17 (3Н, с., NСН₃); 3,35 (2Н, д. д., j = 6,4 Гц, NНСН₂); 4,14 (2Н, т., j = 7,2 Гц, NСН₂); 6,00 (1Н, с., ≥ СН); 6,97 (1Н, т., j = 7,1 Гц, 5-індол); 7,00 (1Н, т., j = 7,1 Гц, 6-індол); 7,14 (1Н, с., 2-індол); 7,2 (2Н, с., 3,5-піридин); 7,27 (1Н, т., j = 7,1 Гц, 6-тіазол); 7,31 (1Н, д., 4-індол); 7,53 (3Н, м., 7-індол + ароматичні протони 5,7-тіазол); 7,85 (1Н, д., j = 7,2 Гц, 4-тіазол); 7,92 (1Н, уш. т., NH); 10,79 (1Н, с., NH, індол).

D-17: 2-{1-[5-(9-акридинілкарбамоїл)-пентил]-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил}-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат. Вихід 0,265 г (65 %); Т_{розкл.} = 165—167 °С. ПМР (ДМСО-d₆) δ: 1,60 (2Н, м., СН₂СН₂СН₂СО); 1,87 (4Н, м., СН₂СН₂СН₂СН₂СО); 2,72 (8Н, м., 2СН₃ + СН₂СО); 3,68 (3Н, с., N-СН₃); 4,26 (2Н, т., j = 7,2 Гц, N-СН₂); 6,00 (1Н, с., ≥ СН); 7,24 (2Н, с., 3,5-піридин); 7,28 (1Н, т., j = 7,2 Гц, 6-тіазол); 7,55 (2Н, м., 5,7-тіазол); 7,63 (2Н, т., j = 7,3 Гц, акридин); 7,86 (3Н, м., 4-тіазол + акридин); 8,12 (2Н, д., j = 8,0 Гц, 1,8-акридин); 8,19 (2Н, д., j = 8,0 Гц, 4,5-акридин); 10,63 (1Н, с., NH).

D-18: 2-{1-[5-(2-діетиламіноетилкарбамоїл)-пентил]-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил}-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат.

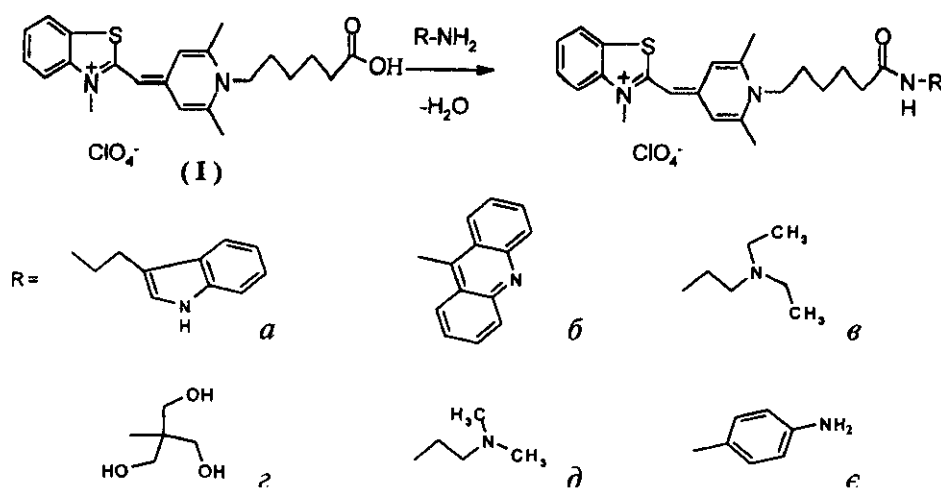


Рис. 2. Схема синтезу і хімічні структури отриманих монометанових ціанінів: D-16 (а); D-17 (б); D-18 (в); D-19 (г); D-21 (д) та D-23 (е)

Вихід 0,265 г (92 %); $T_f = 151-153$ °C. ПМР (ДМСО- d_6) δ : 0,94 (6H, т., $j = 6,8$ Гц, $2CH_2CH_3$); 1,39 (2H, м., $CH_2CH_2CH_2CO$); 1,57 (2H, кв., $j = 6,9$, CH_2CH_2CO); 1,72 (2H, м., NCH_2CH_2); 2,10 (2H, т., $j = 6,3$ Гц, CH_2CO); 2,45 (6H, м., $2NCH_2 + NHCH_2CH_2$); 2,64 (6H, с., $2CH_3$); 3,08 (2H, д. д., $j = 6,4$ Гц, $NHCH_2$); 3,67 (3H, с., NCH_3); 4,15 (2H, т., $j = 7,2$ Гц, NCH_2CH_2); 6,00 (1H, с., $\geq CH$); 6,50 (6H, с.); 7,20 (2H, с., 3,5-піридин); 7,27 (1H, т., $j = 7,2$ Гц, 6-тіазол); 7,5 (2H, м., 5,7-тіазол); 7,6 (1H, уш. с., NH); 7,81 (1H, д., $j = 7,2$ Гц, 4-тіазол).

D-19: 2-(1-[5-[2-гідрокси-1,1-ди-(гідроксиметил)-етилкарбамоїл]-пентил]-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат. Вихід 0,199 г (68 %); $T_f = 191-193$ °C. ПМР (ДМСО- d_6) δ : 1,42 (2H, м., $CH_2CH_2CH_2CO$); 1,60 (2H, кв., $j = 6,9$ Гц, CH_2CH_2CO); 1,73 (2H, м., NCH_2CH_2); 2,20 (2H, т., $j = 6,3$ Гц, CH_2CO); 2,68 (6H, с., $2CH_3$); 3,55 (6H, с., $3CH_2OH$); 3,68 (3H, с., NCH_3); 4,16 (2H, т., $j = 7,2$ Гц, NCH_2); 4,35 (3H, уш. с., $3OH$); 6,00 (1H, с., $\geq CH$); 7,00 (1H, уш. с., NH); 7,22 (2H, с., 3,5-піридин); 7,27 (1H, т., $j = 6,9$ Гц, 6-тіазол); 7,51 (2H, м., 5,7-тіазол); 7,82 (1H, д., $j = 7,4$, 4-тіазол).

D-21: 2-(1-[5-(2-диметиламіноетилкарбамоїл)-пентил]-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат. Вихід 0,248 г (90 %); $T_f = 134-136$ °C. ПМР (ДМСО- d_6) δ : 1,39 (2H, м., $CH_2CH_2CH_2CO$); 1,59 (2H, кв., $j = 6,9$ Гц, CH_2CH_2CO); 1,71 (2H, м., NCH_2CH_2); 2,14 (8H, м., $2NCH_3 + NHCH_2CH_2$); 2,27 (2H, т., $j = 6,3$, CH_2CO); 2,67 (6H, с., $2CH_3$);

3,15 (2H, д. д., $j = 6,4$, $NHCH_2$); 3,67 (3H, с., NCH_3); 4,16 (2H, т., $j = 7,1$ Гц, NCH_2); 6,00 (1H, с., $\geq CH$); 7,21 (2H, с., 3,5-піридин); 7,26 (1H, т., $j = 7,0$ Гц, 6-тіазол); 7,50 (2H, м., 5,7-тіазол); 7,60 (1H, уш. с., NH); 7,84 (1H, д., $j = 8,0$ Гц, 4-тіазол).

D-23: 2-(1-[5-(4-амінофенілкарбамоїл)-пентил]-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорат. Вихід 0,254 г (89 %); $T_{розкл} = 133-135$ °C. ПМР (ДМСО- d_6) δ : 1,45 (2H, м., $CH_2CH_2CH_2CO$); 1,66 (2H, кв., $j = 6,9$ Гц, CH_2CH_2CO); 1,78 (2H, м., NCH_2CH_2); 2,27 (2H, т., $j = 6,3$ Гц, CH_2CO); 2,67 (6H, с., $2CH_3$); 3,67 (3H, с., NCH_3); 4,17 (2H, т., $j = 7,2$ Гц, NCH_2); 4,82 (2H, уш. с., NH_2); 6,01 (1H, с., $\geq CH$); 6,47 (2H, д., $j = 8,0$ Гц, бензен); 7,21 (2H, с., 2,6-піридин); 7,29 (1H, т., $j = 7,2$, 6-тіазол); 7,53 (4H, м., бензен + 5,7-тіазол); 7,86 (1H, д., $j = 7,2$ Гц, 4-тіазол); 9,43 (1H, с., NH).

Результати. Спектральні властивості вільних барвників. Порівняльні характеристики спектрів поглинання та флюоресценції ціанінових барвників у ДМФА та водному буфері наведено в табл. 1.

Характеристики спектрів поглинання. Максимуми поглинання розчинів синтезованих піридинієвих барвників у ДМФА ($\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДМФА}}$) розташовані в інтервалі 440—448 нм і при переході до більш полярного водного буфера зсуваються в короткохвильову область на 1—5 нм. Для ціанінів D-16 та D-17 при переході до буфера спостерігається розширення смуг поглинання, що може свідчити про утворення агрегатів барвників. У спектрах поглинання барвника D-17 у ДМФА та в буфері спостерігається смуга на 359—362 нм, що

Таблиця 1
Спектрально-люмінесцентні характеристики ціанінових барвників

Барвник	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДМФА}}$, нм	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{буфер}}$, нм	$\lambda_{\text{флю}}$, нм	I_0 , в. о.*	ΔS , нм
D-6	444	442	488	0,337	46
D-9	445	442	485	0,213	43
D-16	445	444	488	0,588	42
D-17	359, 447	362, 446	483	0,066	43
D-18	446	442	485	0,42	43
D-19	445	442	482	0,45	40
D-20	446	440	483	0,28	43
D-21	444	441	483	0,33	42
D-23	447	442	483	0,35	41
Суап-40	440	435	483	0,28	48

*Відносні одиниці.

відповідає поглинанню акридинового фрагмента (табл. 1).

Флюоресцентні властивості барвників в. Збудження флюоресценції ціанінових барвників проводили на довжинах хвиль їхніх максимумів поглинання в буфері (для барвника D-17 на 446 нм). Максимуми флюоресценції вільних піридинієвих барвників знаходяться в інтервалі 482—488 нм ($\lambda_{\text{флю}}$). Величини їхніх стоксових зсувів (ΔS) лежать в межах 41—48 нм. Барвники мають незначну власну флюоресценцію (I_0), що становить 0,066—0,588 в. о. (відносні одиниці) (табл. 1).

Інтенсивність флюоресценції барвника D-17 у ДМФА ($I=0,41$ в. о.) у 6 разів перевищує таку цього барвника у водному розчині, тоді як положення максимуму випромінювання та форма смуги ($\lambda_{\text{флю}}^{\text{ДМФА}} = 488$ нм) практично не змінюються.

Спектральні властивості комплексів барвників з нуклеїновими кислотами. Спектральні характеристики комплексів барвників з нуклеїновими кислотами наведено в табл. 2 і 3.

Поглинання комплексів барвників з НК. Максимуми поглинання піридинієвих барвників у комплексах з ДНК та РНК розташовані на 436—450 нм. Форми та інтенсивність смуг поглинання комплексів барвник—ДНК суттєво не відрізняються від таких смуг поглинання відповідних вільних ціанінів, окрім випадку D-17. У спектрах поглинання барвника D-17 у присутності нуклеїнових кислот спостерігається

смуга на 362—364 нм, що відповідає поглинанню акридинового фрагмента (табл. 2).

Поряд з цим у спектрі поглинання D-17 у присутності ДНК спостерігається додаткова агрегаційна смуга на 424 нм, інтенсивність якої практично дорівнює інтенсивності молекулярної смуги. В спектрі поглинання D-17 у буфері чітко вираженої агрегаційної смуги не спостерігалось.

У спектрах поглинання барвників D-16, D-17, D-18, D-21 у присутності РНК, окрім молекулярних смуг ($\lambda_{\text{погл(мол)}}^{\text{РНК}}$), спостерігаються чітко виражені агрегаційні смуги поглинання, довжини хвиль максимумів яких ($\lambda_{\text{погл(агр)}}^{\text{РНК}}$) розташовані при 427—429 нм. Для ціаніна D-17 агрегаційна смуга поглинання є інтенсивнішою за молекулярну ($D_{\text{мол}}/D_{\text{агр}} = 0,9$) (табл. 2).

Флюоресценція комплексів барвників з НК. Збудження флюоресценції комплексів ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами здійснювали на довжинах хвиль молекулярних максимумів поглинання барвників (для комплексів барвника D-17 на 449—450 нм). Максимуми випромінювання комплексів барвників з нуклеїновими кислотами ($\lambda_{\text{флю}}^{\text{ДНК}}$ та $\lambda_{\text{флю}}^{\text{РНК}}$) знаходяться в межах 480—488 нм. Комплекси барвників з ДНК та РНК мають стоксові зсуви ($\Delta S^{\text{ДНК}}$ та $\Delta S^{\text{РНК}}$) у межах 33—47 нм. За цих умов інтенсивність флюоресценції комплексів барвників з НК знаходиться в інтервалі 13,3—89 в. о. для ДНК та 9,7—99 в. о. для РНК. Величина збільшення інтенсивності флюоресценції (ΔQ) є відношенням

Таблиця 2
Спектральні характеристики комплексів ціанінових барвників з ДНК

Барвник	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДНК}}$, нм	$\lambda_{\text{флю}}^{\text{ДНК}}$, нм	$\Delta\lambda^{\text{ДНК}}$, нм	$I_{\text{флю}}^{\text{ДНК}}$, в. о.	$\Delta Q^{\text{ДНК}}$
D-6	448	488	40	61,1	180
D-9	444	488	44	54,5	256
D-16	446	480	34	48,2	83
D-17	362, 424, 450	483	33	13,3	202
D-18	448	485	38	36,4	87,1
D-19	447	483	35	89	198
D-20	446	485	39	45,3	161
D-21	449	483	34	49	149
D-23	447	480	33	65	185
Суап-40	440	480	40	51,1	182

Таблиця 3
Спектральні характеристики комплексів ціанінових барвників з РНК

Барвник	$\lambda_{\text{погл}}(\text{агр})^{\text{РНК}}$, нм	$\lambda_{\text{погл}}(\text{мол})^{\text{РНК}}$, нм	$D_{\text{мол}}/D_{\text{агр}}^*$	$\lambda_{\text{флю}}^{\text{РНК}}$, нм	$\Delta\lambda^{\text{РНК}}$, нм	$I_{\text{флю}}^{\text{РНК}}$, в. о.	$\Delta Q^{\text{РНК}}$, в. о.
D-6	—	440	—	487	47	53,3	157
D-9	—	441	—	488	47	50,8	238
D-16	429	445	0,98	480	35	46,1	79
D-17	429	364, 449	0,9	485	36	9,7	145
D-18	429	446	1,12	482	36	99	236
D-19	—	439	—	485	46	61	146
D-20	—	436	—	485	49	42,4	151
D-21	427	444	1,08	485	41	39	118
D-23	—	443	—	482	39	57	163
Суап-40	—	436	—	482	46	80,8	288

* $D_{\text{мол}}/D_{\text{агр}}$ — співвідношення оптичних густин молекулярної та агрегаційної смуг поглинання.

інтенсивності випромінювання барвника в комплексі з НК до інтенсивності випромінювання чистого барвника. Для комплексів ціанінів з ДНК величина ΔQ становила 83—202 в. о., а для РНК — 79—288 в. о. (табл. 2).

Обговорення результатів. Ця робота є продовженням досліджень, які мають на меті пошук перспективних флюоресцентних зондів для детекції нуклеїнових кислот.

Раніше нами було синтезовано ряд похідних

4-[(1-метилбензотіазоліден-2)-метил]-2,6-диметил-1-алкілпіридинію з різними N-алкільними радикалами в піридинієвому циклі. Дослідження спектральних властивостей отриманих сполук показали, що наявність гідроксильної групи в структурі ціанінів покращує флюоресцентні властивості комплексу барвника з ДНК, а наявність аміногрупи — комплексу з РНК порівняно з вихідним Суап 40. Нами встановлено, що індольний фрагмент у структурі барвника покращує його флюо-

ресцентні властивості в комплексах з нуклеїновими кислотами [3].

Грунтуючись на цих результатах, для синтезу нових флюоресцентних ціанінів ми використали аміноспирт, аліфатичні та ароматичні діаміни. Поряд з індольним гетероциклом при конструюванні барвників нами також був застосований інтеркалюючий акридинової фрагмент, який, на нашу думку, здатний підвищувати стабільність комплексу барвника з ДНК [4].

У попередній публікації [3] описано отримання барвників з використанням реакції пірилоціаніну з аліфатичними амінами. В даній роботі для отримання нових флюоресцентних зондів використано реакцію ціаніну з вільною карбоксильною групою 2-[1-(5-карбоксипентил)-2,6-диметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій перхлорату (I) та первинними аліфатичними та ароматичними амінами (рис. 2).

Розроблено загальну методику синтезу барвників на основі описаного карбонілдімідазолідного методу синтезу пептидів [5]. Для конденсації карбоксильної групи з аміном використано КДІ. Аміноакридин дуже важко піддається N-ацилюванню, тому для отримання сполуки D-17 з добрим виходом ми використали більш активний конденсуючий реагент ДЦК у присутності нуклеофільного каталізатора — гідроксibenзотріазолу [6].

Індивідуальність усіх отриманих сполук доведено за допомогою УФ та ПМР спектроскопії.

Аналізуючи отримані в даній роботі результати, можна стверджувати, що для синтезованих ціанінів у деяких випадках не підтверджується тенденція, виявлена при дослідженні попередньої серії барвників [3]. Так, присутність аміногрупи в структурі барвника D-21 не призводить до підвищення інтенсивності флюоресценції барвника в комплексі з РНК, а присутність гідроксильної групи в структурі D-20 — у комплексі з ДНК (табл. 2). Можливо, це явище спричинене присутністю в складі барвників карбонільної групи, яка може нековалентно взаємодіяти з нуклеїновою кислотою і таким чином впливати на структуру та стабільність комплексу ціанін—НК і відповідно на його флюоресцентні властивості.

Однак для барвника D-19, у молекулі якого присутні три гідроксильні групи, інтенсивність випромінювання в присутності ДНК значно перевищує таку для вихідного Суап 40 (табл. 2), а також для досліджених раніше барвників D-6, D-9 та D-20, що містять лише одну гідроксильну групу. Таким чином, можна припустити, що до зміцнення комплексу барвник—ДНК призводить не лише присутність у структурі лінкера позитивно заряд-

женого азоту (N^+ у складі сперміну та інших біологічних поліамінів [8]), а також наявність гідроксильних груп.

Присутність у молекулі барвника індольного (D-16) та акридинового (D-17) фрагментів спричинює підвищення інтенсивності випромінювання ціаніну в комплексах з ДНК порівняно з комплексами цих барвників з РНК (табл. 2). Ми вважаємо, що наявність інтеркалятора в складі барвника робить можливим додаткову фіксацію його молекули на ДНК.

Для барвників, що містять акридиновий, індольний фрагменти та аміногрупи (окрім ціаніну D-23, що містить ароматичну аміногрупу) в присутності РНК спостерігаються чітко виражені агрегаційні смуги в спектрах поглинання. В той же час для барвників, що містять спиртові групи, при утворенні комплексів з РНК максимума поглинання незначно зсуваються в короткохвильовий бік, а агрегаційні смуги для цих ціанінів не спостерігаються (табл. 2). Можливо, це пояснюється різним механізмом формування комплексів барвник—РНК та різною структурою цих комплексів для ціанінів, які містять гідроксильні та аміногрупи.

Висновки. Для покращання флюоресцентних властивостей барвників у їхню структуру вводять функціональні залишки, які називають «ефекторними групами». Як правило, для всіх відомих барвників-інтеркаляторів (акридини, фенантридини, ціаніни) таку роль виконують позитивно заряджені азотвмісні «спейсерні групи». Результати, отримані в даній роботі, вказують на те, що введення в молекулу барвника D-19 декількох гідроксилів як «ефекторних груп» значно покращує його зв'язування з ДНК. Це відкриває широкі перспективи для конструювання нових флюоресцентних зондів на основі гідроксилвмісних «ефекторних груп».

Введення до структури барвника D-17 гетероциклічного акридинового ядра призводить до значного зниження рівня власної флюоресценції цього барвника порівняно з вихідним Суап 40 (табл. 1). Можливо, це викликано тим, що барвник формує нефлюоресцентні Н-агрегати [7] у водному середовищі, спричинюючи зменшення рівня власної флюоресценції (випромінювання молекулярної форми барвника).

Формування таких агрегаційних структур призводить до зниження рівня власного «молекулярного» випромінювання барвника і, таким чином, до підвищення рівня сигнал/шум (відношення інтенсивності випромінювання зв'язаного з НК ціаніну до випромінювання вільного барвника) та відповідно до зростання чутливості барвника як зонда для детекції НК.

Автори глибоко вдячні М. Ю. Лосицькому за допомогу в підготованні статті до друку.

Д. В. Криворотенко, В. Б. Ковальська, С. Н. Ярмолук

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 16. Новые флюоресцентные бензотиазоло-4-[2,6-диметилпиридиниевые] монометиновые цианиновые красители

Резюме

Синтезированы новые флюоресцентные зонды для детекции нуклеиновых кислот на основе 2-[1-(5-карбокспентил)-2,6-диметил-1,4-дигидро-4-пиридинилиденметил]-3-метил-1,3-бензотиазол-3-ий перхлората. Исследованы спектральные свойства полученных соединений и их комплексов с нуклеиновыми кислотами. Изучено влияние различных функциональных заместителей в молекуле красителя на его взаимодействие с нуклеиновыми кислотами. Полученные результаты показывают, что введение спиртовых групп и акридинового фрагмента в молекулу цианина улучшает его свойства как флюоресцентного зонда.

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

The interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 16. New fluorescent benzothiazole-4-[2,6-dimethylpyridinium] monomethylene cyanine dyes

Summary

New fluorescent probes for nucleic acids detection based on 2-[1-(5-carboxypentyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-4-pyridinylidenmethyl]-3-methyl-1,3-benzothiazole-3-ium perchlorate have been synthesized. The spectral properties of the compounds obtained and their complexes with nucleic acids have been investigated. The influence of different functional substituents in the dye molecule on its interaction with nucleic acids has been studied. The results obtained

show that the inclusion of hydroxy-groups and acridine fragment in the structure of cyanine increases the sensibility of the nucleic acids detection.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Deligeorgiev T. G. Molecular probes based on cyanine dyes for nucleic acid research // Near-Infrared Dyes for High Technology Applications. NATO ASI Series / Eds S. Daehne, U. Resch-Genger, O. S. Wolfbeis.—Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. publ., 1998.—P. 125—139.
2. Yarmoluk S., Kovalska V., Kovtun Y. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 5. Towards model of «half intercalation» of monomethylene cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // Biopolymery i kletka.—1999.—15, N 1.—P. 75—82.
3. Криворотенко Д. В., Ковальська В. Б., Ярмолук С. М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 10. Синтез та спектральні властивості нових бензотіазоло-4-[2,6-диметилпіридинієвих] монометинових ціанінових барвників // Біополімери і клітка.—2000.—16, N 2.—С. 145—152.
4. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—С. 375—388.
5. Гершкович А. А., Кибирев В. К. Химический синтез пептидов.—Киев: Наук. думка, 1992.—С. 52.
6. Гершкович А. А., Кибирев В. К. Химический синтез пептидов.—Киев: Наук. думка, 1992.—С. 48.
7. Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—231 с.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—С. 393—411.

УДК 542.95

Надійшла до редакції 31.05.99