

## Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 14. Спектральні особливості деяких монометинових бензотіазолових ціанінових барвників та їхньої взаємодії з ДНК

Т. Ю. Огульчанський, В. М. Ящук, С. М. Ярмолюк<sup>1</sup>, М. Ю. Лосицький

Київський університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 03033, Україна

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

---

*Досліджували поглинання та флюоресценцію розчинів монометинових бензотіазолових ціанінових барвників тіазолового оранжевого (ТО), Суап 40 та Суап 13 у широкому діапазоні концентрацій за наявності і при відсутності ДНК. Встановлено, що в спектрах поглинання та флюоресценції розчинів досліджуваних барвників без ДНК спостерігаються смуги як молекулярного поглинання та флюоресценції, так і поглинання та флюоресценції агрегатів молекул барвників, причому π-електронна система агрегатів зазнає перебудови після поглинання. Показано, що у випромінюванні розчинів розглянутих барвників у присутності ДНК домінує власна флюоресценція молекул барвників, значний квантовий вихід якої пов'язаний з фіксацією молекули барвника на молекулі ДНК. Виявлено концентраційне гасіння цієї флюоресценції, що супроводжується появою нової смуги в поглинанні. У зв'язку з цим висловлено припущення про утворення агрегатів, які складаються з вільних молекул барвника та молекул барвника, зв'язаних з ДНК. На підставі отриманих даних зроблено висновок про неприйнятність застосування моделі повної інтеркаляції до взаємодії молекул досліджуваних барвників з ДНК та про можливу їхню напівінтеркаляційну взаємодію з ДНК.*

---

Вступ. Ціанінові барвники останнім часом широко застосовуються як флюоресцентні зонди для дослідження різноманітних біологічних об'єктів — клітин, мембран і ліпопротеїнів [1], білків [2] та нуклеїнових кислот (НК) [3—5]. Можливим таке застосування, зокрема, для детектування НК робить те, що інтенсивність флюоресценції розчинів монометинових барвників у присутності НК значно (на декілька порядків) зростає [3]. Для пояснення цього факту пропонувалися різні моделі взаємодії молекул барвників з ДНК. Лерманом [6] запропоновано модель інтеркаляції (intercalative binding), тобто вбудовування планарної частини молекули зонда між сусідніми парами основ ДНК. Пізніше згадана модель неодноразово обговорювалася [7,

9]. Поряд з цим розглядається «борозенкова» модель (groove binding) [12], яка припускає можливість фіксації молекул барвника в борозенках молекули ДНК.

Відомо, що характерною рисою для монометинових ціанінових барвників є висока здатність до агрегатоутворення [13]. У попередніх дослідженнях [11] нами показано, що процеси агрегації, які супроводжують взаємодію ціанінів з нуклеїновими кислотами, впливають на якість барвників як флюоресцентних зондів. Разом з тим агрегація молекул барвників у розчинах при наявності ДНК потребує подальшого вивчення.

Метою даної роботи було встановити характерні спільні спектральні особливості для представників монометинових ціанінових барвників — добре відомого тіазолового оранжевого (thiazole orange — ТО) [8], який широко застосовується для детекту-

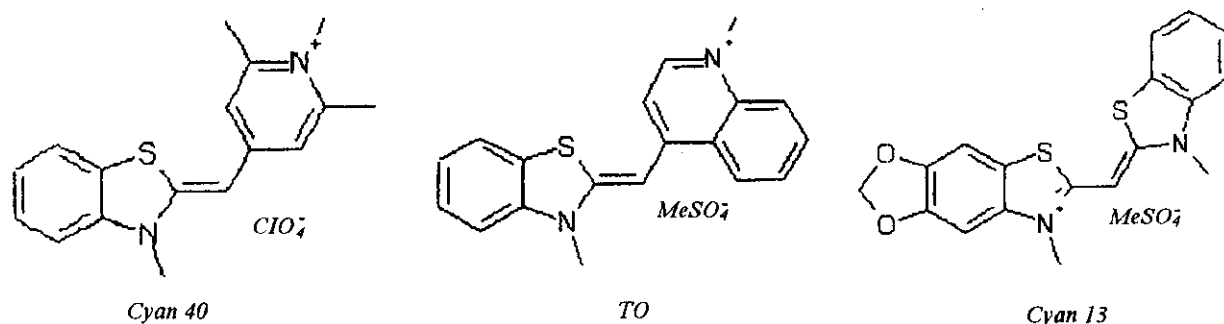


Рис. 1. Структурні формули досліджуваних барвників

вання нуклеїнових кислот [3], синтезованих та досліджених нами раніше Суап 13 [10] та Суап 40 [11] та на підставі отриманих даних виявити можливі механізми взаємодії барвників з ДНК.

**Матеріали і методи.** В роботі досліджували поглинання та флюоресценцію розчинів монометинових ціанінових барвників ТО, Суап 40 та Суап 13 у широкому діапазоні концентрацій за наявності та відсутності ДНК. Барвники були люб'язно надані нам С. Лукашовим. Структурні формули досліджуваних барвників представлені на рис. 1.

Як розчинник в роботі застосовували буфер 0,05 М трис-НСІ, рН 7,5. Розчини барвників, які безпосередньо використовували в експерименті, отримували розведенням у буфері вихідних розчинів до необхідної концентрації. Для отримання вихідних розчинів барвники розчиняли в диметилформаміді (ДМФА) до концентрації  $2 \cdot 10^{-3}$  М. Вихідний розчин ДНК (тотальна ДНК тимусу бика фірми «Sigma», США) готували в буфері. Робочі розчини барвників у присутності ДНК готували розведенням вихідного розчину ДНК у буфері, до якого додавали необхідну кількість вихідного розчину барвника.

Спектри поглинання розчинів досліджуваних речовин реєстрували за допомогою спектрофотометра Spеcоrд M40. Спектри флюоресценції та її збудження записували на спектрофлюориметрі Hitachi 850.

**Результати і обговорення.** *Поглинання та флюоресценція розчинів Суап 40.* Спектри поглинання розчинів Суап 40 різних концентрацій представлені на рис. 2. Як видно з цього рисунка, в спектрі розчинів чистого барвника вирізняється довгохвильова ( $\lambda_{\max 1} = 435$  нм) та короткохвильова ( $\lambda_{\max} = 267$  нм) смуги, інтенсивність яких лінійно залежить від концентрації. Поглинання розчинів

Суап 40 за наявності ДНК для найменших з досліджуваних концентрацій відрізняється невеликим (7 нм) батохромним зсувом, що може бути пов'язано зі зміною параметрів розчинника (наприклад, в'язкості) при додаванні ДНК (рис. 2, крива 1'). При збільшенні концентрації розчину Суап 40 (при незмінній концентрації ДНК) виокремлюється та зростає смуга з максимумом  $\lambda_{\max 2} = 424$  нм (рис. 2, криві 1'—4'). Концентраційна залежність згаданої смуги вказує на її можливу агрегаційну природу. Крім того, з порівняння відповідних смуг поглинання розчинів Суап 40 однакових концентрацій у присутності ДНК та за її відсутності (рис. 2, криві 1', 1; 2', 2; 3', 3; 4', 4) видно, що зі збільшенням концентрації смуга поглинання з  $\lambda_{\max 1} = 442$  нм для розчину з ДНК зростає повільніше, ніж смуга  $\lambda_{\max 1} = 435$  нм для розчину чистого барвника, хоча для невеликої концентрації барвника ( $C = 10^{-5}$  М) інтенсивність смуги з  $\lambda_{\max 1} = 442$  нм, навпаки, більша (рис. 2, криві 1'—1). Можна припустити, що при цій концентрації в розчині з ДНК кількість неагрегованих молекул Суап 40 більша через зв'язування їх з молекулами ДНК. З ростом концентрації у присутності ДНК, ймовірно, відбувається агрегація зв'язаних з ДНК та вільних молекул барвника з утворенням центрів поглинання, відповідальних за смугу  $\lambda_{\max 2} = 424$  нм. Відзначимо, що подібні зміни в поглинанні для різних барвників у розчині з ДНК спостерігалися, зокрема, у дослідженні [3], проте вичерпного пояснення не отримали.

Спектри флюоресценції та її збудження розчинів Суап 40 досліджуваних концентрацій представлені на рис. 3. Для концентрації  $C = 10^{-5}$  М флюоресценцію збуджували випромінюванням з довжинами хвиль  $\lambda_{\text{ex}1} = 385$  нм,  $\lambda_{\text{ex}2} = 400$  нм,  $\lambda_{\text{ex}3} = 435$  нм. Було встановлено, що вигляд спектра

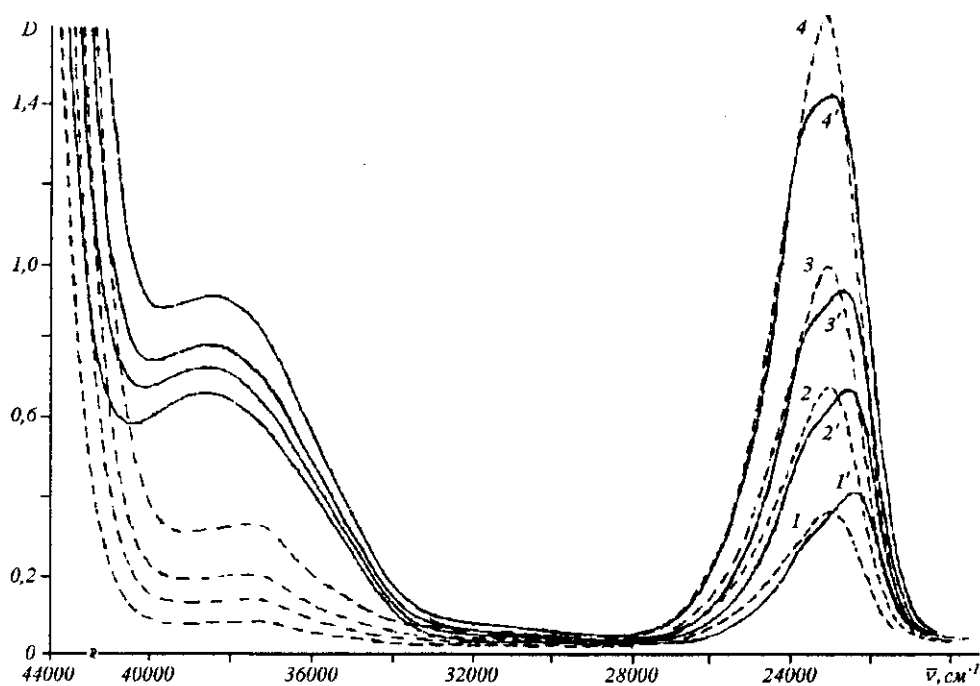


Рис. 2. Спектри поглинання розчинів власне Суап 40 (—) та в присутності (---) ДНК ( $C = 6 \cdot 10^{-5}$  М пар основ). Концентрація Суап 40:  $10^{-5}$  М (1, 1');  $2 \cdot 10^{-5}$  М (2, 2');  $3 \cdot 10^{-5}$  М (3, 3');  $5 \cdot 10^{-5}$  М (4, 4')

флюоресценції залежить від довжини хвилі збудження. Для  $\lambda_{\text{ex}3} = 435$  нм (що відповідає максимуму поглинання) в спектрі флюоресценції розчину Суап 40 (для концентрації  $10^{-5}$  М) домінує смуга з  $\lambda_{\text{em}1} \approx 470$  нм (рис. 3, крива 1), хоча існує також широкий довгохвильовий хвіст. Ця смуга співвідноситься зі смугою поглинання (рис. 2, крива 1) і, очевидно, відповідає переходу  $S_1 \rightarrow S_0$  в молекулі Суап 40. Надалі називатимемо її власною або ж мономерною смугою флюоресценції барвника. Спектр збудження флюоресценції на довжині хвилі  $\lambda_{\text{em}1}$  (рис. 3, крива 1'), як і слід було очікувати, загалом близький до відповідного спектра поглинання, проте звертає на себе увагу наявність відсутньої в поглинанні слабовираженої смуги в діапазоні  $\approx 400$ — $415$  нм. При збудженні флюоресценції цього ж розчину барвника випромінюванням з  $\lambda_{\text{ex}2} = 400$  нм вигляд спектра флюоресценції значно змінюється. Зростає інтенсивність довгохвильової смуги  $\lambda_{\text{em}2} = 590$  нм (рис. 3, крива 2). В спектрі збудження флюоресценції для цієї довжини хвилі домінує смуга з максимумом  $\approx 415$  нм (рис. 3, крива 2'). Варто ще раз зазначити, що відповідна смуга в поглинанні відсутня. Подібна ж картина спостерігається при збудженні флюоресценції випромінюванням з довжиною хвилі  $\lambda_{\text{ex}1} = 385$  нм (рис. 3, крива 3).

При переході до розчину Суап 40 з концентрацією  $5 \cdot 10^{-5}$  М співвідношення інтенсивностей мономерної та довгохвильової смуг флюоресценції змінюється. При збудженні  $\lambda_{\text{ex}3} = 440$  нм,  $\lambda_{\text{ex}2} = 400$  нм,  $\lambda_{\text{ex}1} = 385$  нм значно зростає інтенсивність смуги з максимумом  $590$  нм (рис. 3, криві 4, 5, 6). Відповідно зростає і відносна інтенсивність більш короткохвильової ( $\lambda_{\text{max}} = 415$  нм) смуги в спектрах збудження флюоресценції (рис. 3, криві 3', 4').

Таким чином, можна зробити висновок про існування концентраційно залежних випромінюючих центрів, відповідальних за флюоресценцію з  $\lambda_{\text{ex}2} = 590$  нм. Природно припустити, що ці центри є агрегатами молекул барвника. Прояв відповідної смуги ( $\lambda_{\text{max}} = 415$  нм) у спектрах збудження флюоресценції свідчить про існування агрегатів, які зумовлюють випромінювання на  $590$  нм в основному стані. З іншого боку, те, що відповідна смуга в поглинанні відсутня (або ж не вирізняється), може свідчити на користь незначного коефіцієнта екстинкції агрегатів, а також відносно значного квантового виходу їхньої флюоресценції. Крім того, аномально великий Стоксів зсув агрегатної флюоресценції ( $\lambda_{\text{em}2} = 590$  нм) порівняно з відповідною смугою в спектрі збудження ( $\lambda_{\text{max}} = 415$  нм), безумовно, свідчить про настільки значну перебудову

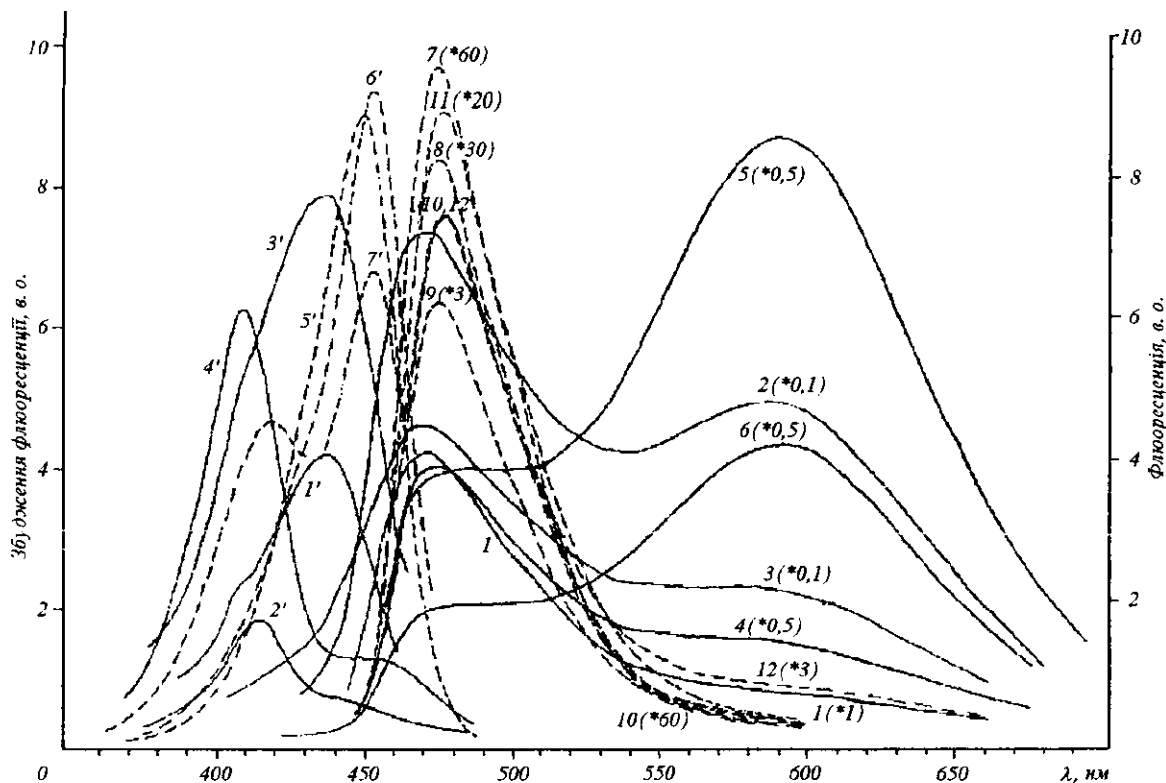


Рис. 3. Спектри флюоресценції та збудження флюоресценції розчинів власне Суап 40 (—) та в присутності (---) ДНК ( $C = 6 \cdot 10^{-5}$  М пар основ. Концентрації Суап 40:  $10^{-5}$  М (1, 1', 2, 2', 3, 5', 7, 8, 9);  $5 \cdot 10^{-5}$  М (3', 4', 6', 7', 4, 5, 6, 10, 11, 12). Флюоресценцію збуджували  $\lambda_{\text{ex1}} = 385$  нм (3, 6, 9, 12);  $\lambda_{\text{ex2}} = 400$  нм (2, 5);  $\lambda_{\text{ex3}} = 435$  нм (1, 4);  $\lambda_{\text{ex4}} = 420$  нм (8, 11);  $\lambda_{\text{ex5}} = 440$  нм (7, 10). 1' — збудження флюоресценції  $\lambda_{\text{max}} = 470$  нм; 2' —  $\lambda_{\text{max}} = 590$  нм; 3' —  $\lambda_{\text{max}} = 470$  нм; 4' —  $\lambda_{\text{max}} = 590$  нм; 5' —  $\lambda_{\text{max}} = 475$  нм; 6' —  $\lambda_{\text{max}} = 480$  нм; 7' —  $\lambda_{\text{max}} = 590$  нм

$\pi$ -електронної системи агрегатів після поглинання кванта збуджуючого світла, що випромінює вже, фактично, інша система.

**Флюоресценція розчинів Суап 40 у присутності ДНК.** Спектри флюоресценції та збудження флюоресценції розчинів Суап 40 при наявності ДНК представлені на рис. 3. Характерною їхньою рисою є значне (принаймні, на два порядки) зростання інтенсивності порівняно зі спектрами власне Суап 40. При збудженні флюоресценції розчину з концентрацією  $C = 10^{-5}$  М в області власного поглинання молекул барвника ( $\lambda_{\text{ex3}} = 440$  нм) спостерігається флюоресценція з максимумом біля 475 нм, у 140 разів інтенсивніша за флюоресценцію даного розчину при відсутності ДНК (рис. 3, криві 7, 1). Невеликий зсув флюоресцентної смуги та смуги збудження флюоресценції при переході до розчину з ДНК відповідає зсуву смуги поглинання.

Близкість максимумів даних смуг, відповідних смуг збудження флюоресценції (рис. 3, криві 5', 1') та поглинання свідчить на користь єдиної природи флюоресценції в області 475 нм при наявності ДНК та без неї. Тобто у присутності ДНК маємо ту ж мономерну флюоресценцію молекул Суап 40, що й у випадку без ДНК.

Виникає питання щодо причини значного зростання квантового виходу флюоресценції молекул барвника при переході до розчину ДНК. На наш погляд, нею може бути жорстка фіксація молекул Суап 40 при взаємодії з молекулами ДНК, за рахунок чого значно зростає ймовірність дезактивації збудження молекули барвника через випромінювання. Механізм такої взаємодії, скоріш за все, полягає в повній чи частковій інтеркаляції молекул Суап 40 між парами основ ДНК.

Хоча в спектрі флюоресценції розчину Суап 40

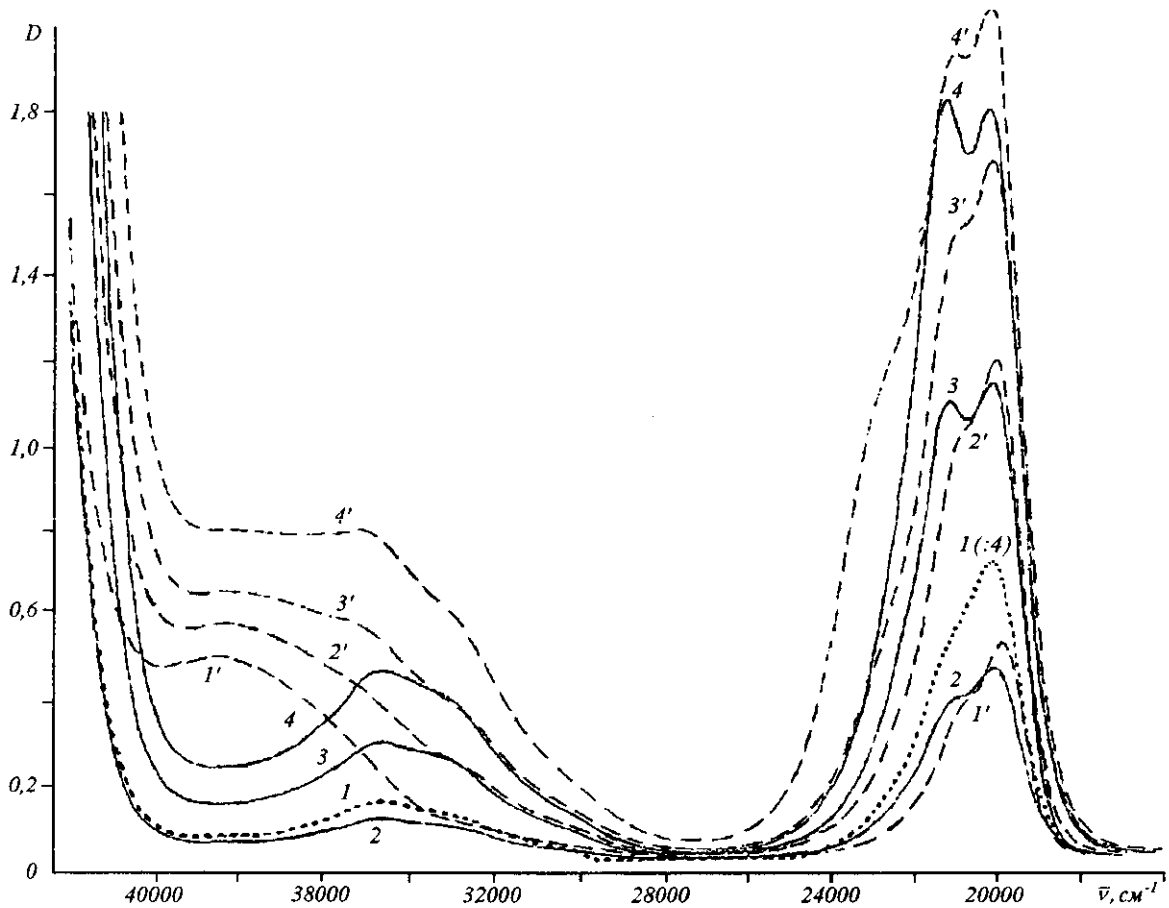


Рис. 4. Спектри поглинання розчинів власне ТО (—) та в присутності (---) ДНК ( $C = 6 \cdot 10^{-5}$  М пар основ). Концентрація ТО:  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М (1);  $10^{-5}$  М (2, 1');  $3 \cdot 10^{-5}$  М (3, 2');  $5 \cdot 10^{-5}$  М (4, 3');  $5 \cdot 10^{-5}$  М (4')

з концентрацією  $C = 5 \cdot 10^{-5}$  М при збудженні  $\lambda_{\text{exl}} = 385$  нм спостерігається агрегатна смуга, яка має відповідну їй смугу у спектрі збудження (рис. 3, криві 12, 7'), проте інтенсивність агрегатної флюоресценції практично однакова для розчину барвника у присутності ДНК та без неї (рис. 3, криві 1, 2, 6). Це знову ж таки свідчить на користь інтеркаляційного механізму у зв'язку з тим, що при переході до розчину з ДНК підсилюється лише мономерна флюоресценція при незначній агрегатній (це пов'язано зі стеричними перешкодами інтеркаляції агрегату в ДНК). З іншого боку, зменшення інтенсивності флюоресценції 475 нм при переході від концентрації барвника в розчині  $C = 10^{-5}$  М до  $C = 5 \cdot 10^{-5}$  М (рис. 3, криві 7, 10), на наш погляд, свідчить про малу ймовірність повної інтеркаляції молекул Суап 40 у ДНК. Інакше

випромінювання молекул, що повністю проінтеркалювали, не залежало б до такої міри від збільшення концентрації молекул барвника в розчині.

**Поглинання та флюоресценція розчинів ТО.**  
**П о г л и н а н н я.** Спектри поглинання розчинів ТО для різних концентрацій наведено на рис. 4. Подібно до поглинання розчину Суап 40 у спектрі поглинання розчину ТО найменшої з досліджуваних концентрацій ( $C = 2,5 \cdot 10^{-6}$  М) виділяється довгохвильова ( $\lambda_{\text{max1}} \approx 500$  нм) та короткохвильова ( $\lambda_{\text{max3}} \approx 287$  нм,  $\lambda_{\text{max4}} \approx 303$  нм) смуги (рис. 4, крива 1). Крім цього, на схилі довгохвильової смуги 500 нм вирізняється плече з  $\lambda_{\text{max2}} \approx 475$  нм. При переході до розчинів більших концентрацій інтенсивність смуги 475 нм у спектрі поглинання зростає так, що при  $C = 4 \cdot 10^{-5}$  М стає рівною інтенсивності смуги 500 нм (рис. 4, криві 1—4).

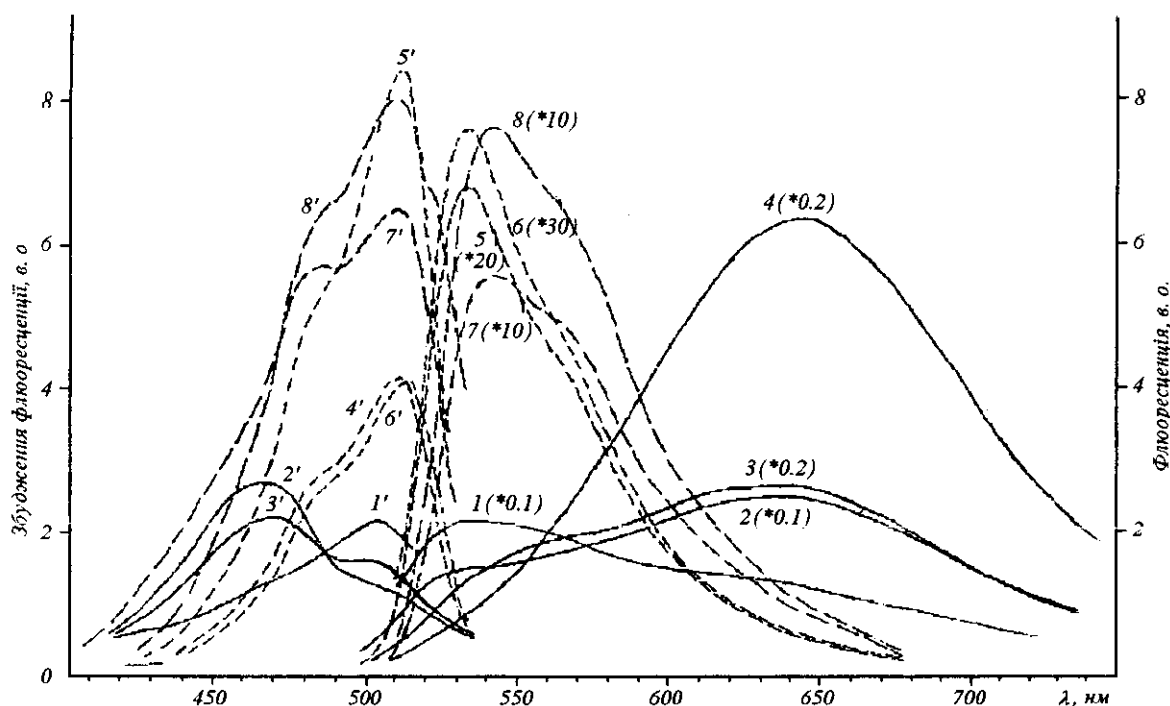


Рис. 5. Спектри флюоресценції та збудження флюоресценції розчинів власне ТО (—) та в присутності (---) ДНК ( $C = 6 \cdot 10^{-5}$  М пар основ). Концентрації ТО:  $10^{-5}$  М (1, 1', 2, 2', 3', 4', 5, 5', 6);  $5 \cdot 10^{-5}$  М (3, 4, 6', 7, 7', 8, 8'). Флюоресценцію збуджували  $\lambda_{\text{ек1}} = 475$  нм (2, 4, 5, 7);  $\lambda_{\text{ек2}} = 500$  нм (1, 3, 6, 8). 1' — збудження флюоресценції  $\lambda_{\text{мак}} = 535$  нм; 2' —  $\lambda_{\text{мак}} = 635$  нм; 3' —  $\lambda_{\text{мак}} = 600$  нм; 4' —  $\lambda_{\text{мак}} = 635$  нм; 5' —  $\lambda_{\text{мак}} = 535$  нм; 6' —  $\lambda_{\text{мак}} = 575$  нм; 7' —  $\lambda_{\text{мак}} = 635$  нм; 8' —  $\lambda_{\text{мак}} = 535$  нм

Така концентраційна залежність дає змогу стверджувати, що поглинання в області 475 нм визначається агрегатами молекул ТО, які існують в основному стані. Смуга з  $\lambda_{\text{мак1}} \approx 500$  нм, очевидно, пов'язана з власним поглинанням молекул ТО.

У спектрах поглинання розчинів ТО з додаванням ДНК також спостерігаються відповідні смуги з невеликим ( $\approx 5$  нм) батохромним зсувом (рис. 4, криві 1'—4'). Цікава особливість виявляється при порівнянні спектрів поглинання розчинів ТО однакової концентрації у присутності та без ДНК. Так, при  $C = 10^{-5}$  М для розчину з ДНК інтенсивність власного поглинання молекул ТО вище, а агрегатного — нижче, ніж для розчину без ДНК (рис. 4, криві 1', 2). Це може свідчити про те, що присутність у розчині молекул ДНК заважає агрегатуванню. При зростанні концентрації інтенсивність власного поглинання молекул ТО для розчину з ДНК зростає повільніше, ніж для розчину без ДНК, так що при  $C = 5 \cdot 10^{-5}$  М інтенсивність молекулярного поглинання з ДНК стає нижчою відносно розчину без ДНК (рис. 4, криві 3', 4).

Одночасно з цим у спектрах поглинання розчинів ТО з ДНК починає проявлятися та зростати смуга  $\approx 435$  нм, відносна інтенсивність якої також залежить від концентрації (рис. 4, криві 3', 4').

Загалом наведені вище результати можна пояснити наступним чином. Наявність молекул ДНК у розчині ТО не сприяє утворенню агрегатів (наприклад, частина молекул ТО зв'язується з молекулами ДНК і не бере участі в утворенні агрегатів). Із зростанням кількості молекул ТО в розчині виникає ситуація, коли вільні молекули ТО взаємодіють із зв'язаними з молекулою ДНК. Таким чином, утворюється агрегат молекул ТО, який завдяки участі в цьому молекули ДНК має іншу структуру і відповідно основний стан, ніж для агрегату молекул ТО без участі молекул ДНК. Існування такого агрегату і зумовлює наявність смуги поглинання  $\approx 435$  нм. Відзначимо, що наведені вище результати свідчать не на користь моделі повної інтеркаляції.

**Флюоресценція.** Флюоресценцію та збудження флюоресценції розчинів ТО деяких з

досліджуваних концентрацій наведено на рис. 5. Як і у випадку з Суап 40, вигляд спектрів флюоресценції залежить від довжини хвилі збудження та концентрації досліджуваних розчинів. При збудженні розчину ТО з  $C = 10^{-5}$  М в області власного (молекулярного) поглинання  $\lambda_{ex} = 500$  нм у спектрі флюоресценції спостерігається смуга з  $\lambda_{max} \approx 535$  нм. Крім цього, в довгохвильовій області помітна менш інтенсивна широка смуга з  $\lambda_{max} \approx 635$  нм (рис. 5, крива 1). Спектр збудження флюоресценції з  $\lambda_{max} \approx 535$  нм близький до власного поглинання молекул ТО (рис. 5, крива 1'; рис. 4). При збудженні флюоресценції цього ж розчину в області агрегатного поглинання ( $\lambda_{ex} = 475$  нм) має місце перерозподіл інтенсивностей смуг флюоресценції з максимумами 535 та 635 нм (рис. 5, крива 2). В спектрі збудження флюоресценції з  $\lambda_{max} \approx 635$  нм домінує смуга 475 нм, що відповідає агрегатному поглинанню (рис. 5, крива 2'). Таким чином, як і для Суап 40, більш короткохвильова смуга флюоресценції ( $\lambda_{max} \approx 535$  нм) відповідає власній (мономерній) флюоресценції молекул барвника, а довгохвильова ( $\lambda_{max} \approx 635$  нм) — випромінюванню агрегатів, що зазнають перебудови, поглинувши квант світла. Це підтверджується також і спектрами флюоресценції для розчину  $C = 5 \cdot 10^{-5}$  М. Якщо при збудженні в області власного поглинання молекул ТО ( $\lambda_{ex} = 500$  нм) мономерна флюоресценція ще проявляється, то при  $\lambda_{ex} = 475$  нм домінує випромінювання агрегатів (рис. 5, криві 3, 4). Відзначимо, що в [3] цю смугу пов'язують з власною флюоресценцією молекул ТО, на підставі чого автори твердять про «аномально великий Стоксів зсув» для випромінювання молекул ТО.

Флюоресценція розчинів ТО в присутності ДНК відзначається, як і для Суап 40, значним зростанням інтенсивності. Інтенсивність флюоресценції розчину  $C = 10^{-5}$  М у присутності ДНК майже в 1000 разів вища, ніж інтенсивність флюоресценції розчину такої ж концентрації без ДНК (рис. 5, криві 1, 6). Максимум смуги флюоресценції розчину ТО з ДНК збігається з максимумом власної флюоресценції барвника (535 нм) (рис. 5, криві 1, 6). Спектр збудження флюоресценції з  $\lambda_{max} = 535$  нм для випадку з ДНК близький до спектра збудження мономерної флюоресценції ТО без ДНК та до спектра поглинання розчину ТО (рис. 5, криві 1', 5'; рис. 4). Це дає змогу стверджувати, що, як і у випадку з Суап 40, флюоресценція розчину ТО з ДНК є власним мономерним випромінюванням молекул барвника, квантовий вихід якого зріс у результаті жорсткої фіксації при зв'язуванні з молекулою ДНК.

Флюоресценція розчину ТО концентрації  $C =$

$= 5 \cdot 10^{-5}$  М відрізняється від такої розчину  $C = 10^{-5}$  М невеликим ( $\approx 7$  нм) довгохвильовим зсувом. Крім того, інтенсивність флюоресценції зменшилася порівняно з розчином нижчої концентрації приблизно в 3 рази (рис. 5, криві 6, 8). Можливим поясненням цього, враховуючи наведені вище дані з поглинання, є те, що при збільшенні концентрації молекул ТО в розчині та взаємодії з молекулами барвника, які зв'язалися з молекулою ДНК, квантовий вихід власної флюоресценції зв'язаних з ДНК молекул зменшується в результаті цієї взаємодії. Останнє (як і для Суап 40) свідчить не на користь моделі повної інтеркаляції, оскільки при такій інтеркаляції взаємодія вільних молекул ТО з молекулами барвника, жорстко зафіксованими та малодоступними в молекулі ДНК, не вплинула б так на ймовірність випромінювальної дезактивації збудження, тобто на квантовий вихід флюоресценції.

Агрегатна флюоресценція ( $\lambda_{max} \approx 635$  нм) не підсилюється в розчині з ДНК (як і для Суап 40), тому, природно, що відповідна смуга не вирізняється на фоні хвоста набагато інтенсивнішої мономерної флюоресценції (рис. 5, крива 7). Проте в спектрі збудження флюоресценції для  $\lambda = 635$  нм агрегатна складова ( $\lambda = 475$  нм) присутня (рис. 5, крива 7').

*Поглинання та флюоресценція розчинів Суап 13. П о г л и н а н н я.* Поглинання розчинів Суап 13 досліджуваних концентрацій (рис. 6) загалом відрізняється від поглинання ТО лише положенням максимумів відповідних смуг. У спектрі поглинання спостерігається мономерна ( $\lambda_{max} = 440$  нм), агрегатна ( $\lambda_{max} = 417$  нм) смуги та смуга, яка з'являється при наявності ДНК у розчині ( $\lambda_{max} = 395$  нм) та яку (аналогічно до ТО) ми пов'язуємо із взаємодією вільних та зв'язаних з молекулою ДНК молекул барвника. Звертає на себе увагу той факт, що, починаючи з деякої концентрації (рис. 6, крива 4'), інтенсивність смуги 395 нм перестає зростати з підвищенням концентрації, в той час як інтенсивності мономерної та агрегатної смуг поглинання продовжують збільшуватися (рис. 6, крива 5'). На наш погляд, це пов'язано з тим, що, починаючи з такої концентрації, максимально можлива кількість вільних молекул Суап 13 зв'язується із зв'язаними з ДНК молекулами барвника, і подальше зростання кількості молекул барвника призводить лише до зростання мономерного та агрегаційного поглинання так, як це було б за відсутності ДНК у розчині.

*Ф л ю о р е с ц е н ц і я.* Флюоресценція розчинів Суап 13 без ДНК, у першу чергу, відрізняється від флюоресценції розчинів ТО та Суап

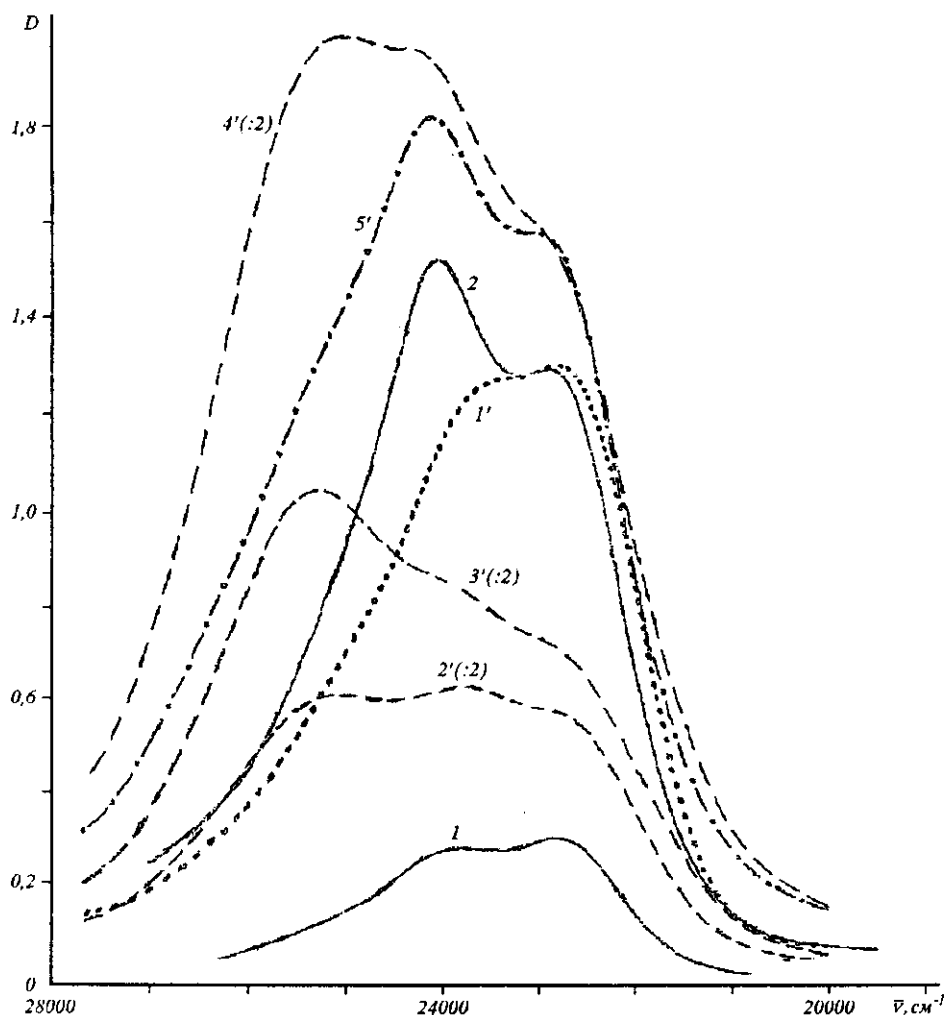


Рис. 6. Спектри поглинання розчинів власне Суап 13 (—) та в присутності (---, - - -, ···) ДНК ( $C = 9 \cdot 10^{-6}$  М пар основ. Концентрація Суап 13:  $10^{-6}$  М (1');  $5 \cdot 10^{-6}$  М (1, 2');  $10^{-5}$  М (3');  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М (4');  $3 \cdot 10^{-5}$  М (2);  $5 \cdot 10^{-5}$  М (5')

40 відсутністю чітко вираженого мономерного випромінювання. Починаючи уже з найменшої з досліджуваних концентрацій ( $C = 6,25 \cdot 10^{-7}$  М) у спектрі флюоресценції домінує широка довгохвильова смуга ( $\lambda_{\max} \approx 515$  нм) (рис. 7, криві 1, 2). З іншого боку, вигляд спектра збудження флюоресценції залежить від довжини хвилі флюоресценції. Так, для  $\lambda_{em} = 505$  нм порівняно з  $\lambda_{em} = 515$  нм у спектрі збудження інтенсивнішою є смуга  $\lambda_{max} = 440$  нм, яка відповідає мономерному поглинанню. Для  $\lambda_{em} = 515$  нм, навпаки, зростає відносна агрегатна інтен-

сивність смуги  $\lambda_{max} = 417$  нм (рис. 7, криві 1', 2'). Тобто, як і для Суап 40 та ТО, більш короткохвильова складова флюоресценції пов'язана з мономерним випромінюванням, а довгохвильова — з агрегатним. Відсутність чітко вираженої мономерної флюоресценції, очевидно, може бути пов'язана з особливостями будови молекули Суап 13 та викликана невисокою ймовірністю випромінювальної дезактивації енергії збудження і значною здатністю до агрегатоутворення. Флюоресцентна смуга  $\lambda_{max} \approx 515$  нм (рис. 7, криві 1, 2, 4), таким чином,



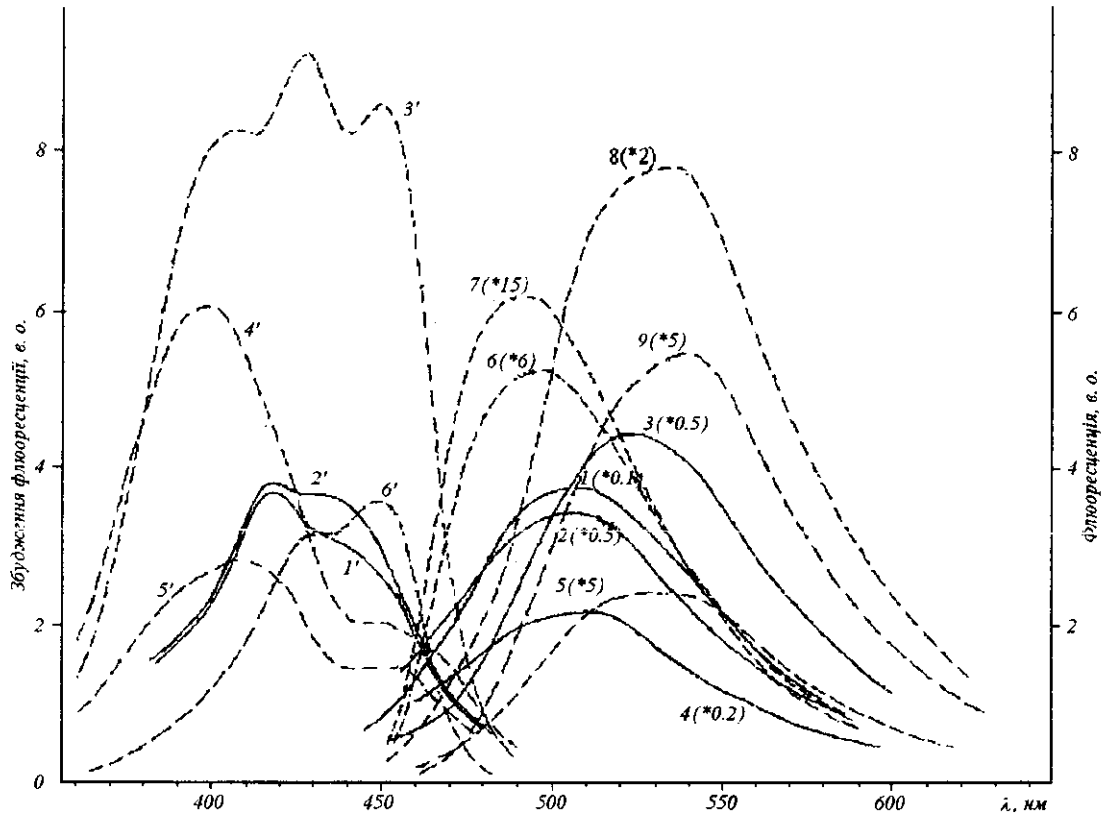


Рис. 7. Спектри флюоресценції та збудження флюоресценції розчинів власне Суан13 (—) та в присутності (---) ДНК ( $C = 1,5 \cdot 10^{-5}$  М пар основ). Концентрації Суан13:  $6,25 \cdot 10^{-7}$  М (1, 1', 2, 2');  $1,25 \cdot 10^{-6}$  М (4);  $10^{-5}$  М (3, 7);  $2 \cdot 10^{-5}$  М (6, 8, 3', 6');  $6 \cdot 10^{-5}$  М (4', 5', 5, 9). Флюоресценцію збуджували  $\lambda_{ex1} = 380$  нм (3, 8, 9);  $\lambda_{ex2} = 420$  нм (1);  $\lambda_{ex3} = 440$  нм (2, 4, 5, 6, 7). 1' — збудження флюоресценції  $\lambda_{max} = 505$  нм; 2' —  $\lambda_{max} = 515$  нм; 3' —  $\lambda_{max} = 550$  нм; 4' —  $\lambda_{max} = 550$  нм; 5' —  $\lambda_{max} = 495$  нм; 6' —  $\lambda_{max} = 495$  нм

складається зі слабкої смуги власної флюоресценції та агрегатної смуги, яка домінує при більших концентраціях (рис. 7, крива 3).

Інтенсивна флюоресценція ( $\lambda_{max} \approx 495$  нм), яка з'являється в розчині Суан 13 з ДНК (рис. 7, криві 6, 7), на нашу думку, подібно до випадків з Суан 40 та ТО є власним мономерним випромінюванням молекул Суан 13, квантовий вихід якого зростає при фіксації в результаті зв'язування з молекулою ДНК. Це підтверджується і спектром збудження флюоресценції  $\lambda_{em} = 495$  нм, який близький до відповідного спектра поглинання (рис. 6, крива 1; рис. 7, крива 6').

Цікавим видається той факт, що при збудженні в області поглинання, яка відповідає центрам, утвореним взаємодією молекул, що зв'яза-

лися з молекулами ДНК ( $\lambda_{ex} = 395$  нм), спостерігається досить інтенсивна смуга флюоресценції з  $\lambda_{max} \approx 540$  нм (рис. 7, крива 8). У спектрі збудження цієї флюоресценції має місце інтенсивна смуга, що якраз і відповідає агрегатам, утвореним молекулами, зв'язаними з молекулами ДНК (рис. 7, крива 3'). Отже, флюоресценція з  $\lambda_{max} \approx 540$  нм є випромінюванням цих агрегатів,  $\pi$ -електронна система яких зазнала перебудови після поглинання кванту світла.

Принциповою відмінністю для Суан 13 порівняно з вищенаведеними даними стосовно Суан 40 та ТО є те, що при переході до більшої концентрації барвника в розчині з ДНК ( $9 \cdot 10^{-6}$  М) у спектрі флюоресценції спостерігається смуга з  $\lambda_{max} = 540$  нм навіть при збудженні в області влас-

ного поглинання барвника (рис. 7, крива 5). Мономерного випромінювання зв'язаних з ДНК молекул Суап13 ( $\lambda_{\text{max}}$  495 нм) не спостерігається. Цей факт можна трактувати наступним чином. При збільшенні концентрації барвника в розчині вільні молекули Суап 13 так взаємодіють з молекулами, зв'язаними з ДНК, що ефективно гасять випромінювання зв'язаних з ДНК молекул Суап 13. З нашої точки зору, останнє є серйозним запереченням проти моделі повної інтеркаляції молекул Суап 13 до молекули ДНК.

Таким чином, підсумовуючи наведені вище дані, зазначимо, що в поглинанні та флюоресценції розчинів розглянутих менометинових ціанових барвників проявляються спільні риси. В спектрах поглинання розчинів без ДНК виділяється більш довгохвильова смуга, пов'язана з мономерним (власним) поглинанням молекул барвників, та концентраційно залежна короткохвильова смуга поглинання агрегатів молекул барвників, які існують в основному стані.

У спектрах флюоресценції розчинів досліджуваних барвників без ДНК спостерігаються дві смуги флюоресценції, відношення їхніх спектральних інтенсивностей залежить від довжини хвилі збудження. Більш короткохвильовою з цих смуг є мономерне випромінювання молекул барвників, довгохвильовою — випромінювання агрегатів,  $\pi$ -електронна система яких зазнала перебудови після поглинання кванту світла. Зазначимо, що неперевірені агрегати не випромінюють.

У випромінюванні розчинів розглянутих барвників у присутності ДНК домінує власна флюоресценція молекул барвників. Її квантовий вихід стрімко зростає в результаті фіксації молекули барвника на молекулі ДНК. Оскільки це не супроводжується суттєвими змінами в спектрах поглинання, то, на наш погляд, можна зробити висновок стосовно того, що фіксація молекули барвника на молекулі ДНК не призводить до утворення нових центрів поглинання. Крім того, спектри збудження смуги флюоресценції, яка домінує у випромінюванні розчинів барвників у присутності ДНК, близькі до відповідних спектрів поглинання розчинів барвників без ДНК. Це також підтверджує власний характер флюоресценції розчинів барвників у присутності ДНК.

При зростанні відношення кількості вільних молекул барвника до кількості пар основ ДНК спостерігається падіння інтенсивності флюоресценції фіксованих на ДНК молекул барвника, що супроводжується появою нової смуги в спектрі поглинання. Це дає змогу припустити, що утворюються агрегати, які складаються з вільних молекул

барвника та молекул барвника, зв'язаних з ДНК. Ці агрегати (назвемо їх «агрегати II») завдяки участі в них молекули ДНК мають іншу структуру і відповідно основний стан, ніж агрегати молекул барвника без участі молекул ДНК. Варто відзначити, що нами встановлено певну концентрацію Суап 13 у розчині (при постійній концентрації ДНК), коли інтенсивність відповідної «агрегатам II» смуги поглинання досягає максимуму. Відношення кількості молекул барвника до кількості пар основ ДНК при цьому  $\approx 3:1$ . Це означає, що при даних концентраціях Суап 13 і ДНК у розчині кількість «агрегатів II» досягає максимально можливого значення, тобто більшість з-поміж фіксованих на ДНК молекул барвника взаємодіє з молекулами Суап 13, утворюючи «агрегати II». Подальше підвищення кількості молекул барвника призводить лише до зростання поглинання мономерів та агрегатів так, як це було б за відсутності ДНК у розчині. З іншого боку, на нашу думку, момент, коли відповідна «агрегатам II» смуга починає проявлятися в спектрах поглинання і одночасно інтенсивність флюоресценції фіксованих на ДНК молекул барвника починає знижуватися, відповідає максимальному «заповненню» місць на молекулі ДНК, на яких фіксуються молекули барвника.

Як здається, наведені вище дані дають можливість оцінити відношення кількості молекул барвника до кількості пар основ ДНК, яке призводить до найбільшого оптичного відгуку системи. Останнє, в свою чергу, вказує на те, де саме з молекулою ДНК зв'язуються молекули барвника, і, таким чином, на можливий механізм взаємодії ДНК з досліджуваними барвниками.

Крім того, отримані результати свідчать про неправомірність застосування моделі повної інтеркаляції молекул досліджуваних барвників до молекул ДНК. Одним з основних заперечень проти цієї моделі є те, що у випадку її реалізації зв'язана з ДНК молекула барвника цілковито знаходиться між парами основ ДНК і не може утворювати агрегату з вільною молекулою барвника, тоді як на існування таких агрегатів («агрегати II») вказують наведені вище дані. Крім того, у випадку інтеркаляції повинні були б виникати зв'язані стани (наприклад, ексиплекси між  $\pi$ -електронними системами ДНК та барвника). В цьому разі у спектрах люмінесценції (а в деяких випадках і в спектрах поглинання) повинні спостерігатися відповідні зміни. Однак ми не помітили істотних спектральних змін у спектрі ДНК у присутності барвника. З іншого боку, значне зростання квантового виходу власної флюоресценції барвників при взаємодії з ДНК свідчить про досить жорстку фіксацію моле-

кули барвника на молекулі ДНК. Це дає змогу припустити можливість напівінтеркаляції, коли деяка частина молекули барвника знаходиться поза основами ДНК і є доступною для утворення агрегату, а монометинний зв'язок, навколо якого відбувається відповідальний за безвипромінювальну дезактивацію енергії збудження коливальний рух, жорстко зафіксовано між парами основ ДНК.

**Висновки.** Таким чином, наведені дані не підтверджують можливості застосування моделі повної інтеркаляції молекул досліджуваних барвників до молекули ДНК та дають змогу запропонувати напівінтеркаляційну модель взаємодії молекул барвників з ДНК. Крім того, отримані результати можуть бути використані для направленої синтезу барвників як флуоресцентних зондів ДНК.

*Т. Ю. Огульчанский, В. Н. Яцук, С. Н. Ярмолук, М. Ю. Лосицкий*

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 14. Спектральные особенности некоторых монометинных бензотиазоловых цианиновых красителей и их взаимодействия с ДНК

#### Резюме

Исследовали поглощение и флуоресценцию растворов монометинных бензотиазоловых цианиновых красителей тиазолового оранжевого (ТО), Cyan 40 и Cyan 13 в широком диапазоне концентраций в присутствии и в отсутствие ДНК. Установлено, что в спектрах поглощения и флуоресценции растворов исследуемых красителей наблюдаются полосы как молекулярного поглощения и флуоресценции, так и поглощения и флуоресценции агрегатов молекул красителей, причем  $\pi$ -электронная система агрегатов существенно трансформируется после поглощения. Показано, что в излучении растворов рассматриваемых красителей в присутствии ДНК доминирует собственная флуоресценция молекул красителей, значительный квантовый выход которой объясняется фиксацией молекулы красителя на молекуле ДНК. Обнаружено концентрационное тушение этой флуоресценции, что сопровождается появлением новой полосы в спектре поглощения. В связи с этим высказано предположение об образовании агрегатов, состоящих из свободных молекул красителя и молекул красителя, связанных с ДНК. На основании полученных данных сделан вывод о неприемлемости модели полной интеркаляции к взаимодействию молекул исследуемых красителей с ДНК и о возможном их полунтеркаляционном взаимодействии с ДНК.

*T. Yu. Ogul'chansky, V. M. Yashchuk, S. M. Yarmoluk, M. Yu. Losytsky*

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 14. Spectral peculiarities of several monomethyne benzothiazole cyanine dyes and their interaction with DNA

#### Summary

Absorption, fluorescence emission and excitation spectra of solutions of monomethyne benzothiazole cyanine dyes — thiazole orange (TO), Cyan 40 and Cyan 13 — have been studied in a wide

concentration range in the presence and without DNA. It has been established that both molecular and aggregate absorption as well as both molecular and aggregate fluorescence are observed for the solutions of the dyes investigated, the aggregates electron system being essentially transformed after photon absorption. It has been shown that the own fluorescence of dye molecules dominates in emission of the investigated dye solutions with DNA. Its considerable quantum yield can be explained by the dye molecule fixation on the DNA molecule. The concentration quenching of this fluorescence has been found and it is accompanied with the appearance of a new absorption band. It has been supposed that the aggregates consisting of dye molecules fixed on DNA and free dye molecules are formed. On the ground of the data obtained we have concluded that the dye molecules interact through half-intercalation mode with DNA molecules and that the model of full intercalation is inapplicable to the interaction of the dyes investigated with DNA molecules.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доберцов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.—М.: Наука, 1989.—274 с.
2. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков.—Київ: Наук. думка, 1988.—280 с.
3. Rye H. S., Yue S., Wemmer D. E., Quesada M. A., Haughland R. P., Mathies R. A., Glazer A. 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.
4. Skeidsvoll J., Ueland P. M. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced detection using the monomeric dye Sybr Green I // Anal. Biochem.—1995.—231.—P. 359—365.
5. 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.
6. Lerman L. S. The structure of the DNA-acridine complex // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1963.—49.—P. 94—102.
7. Long E. S., Barton J. K. On demonstrating DNA intercalation // Acc. Chem. Res.—1990.—23, N 9.—P. 271—273.
8. Lee G., Chen C., Chiu L. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis // Cytometry.—1986, 7.—P. 508—517.
9. Rye H. S., Glazer A. N. Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA // Nucl. Acids Res.—1995.—23, N 7.—P. 1215—1222.
10. Yarmoluk S., Kovalska V., Smirnova T., Shandura M., Kovtun Yu., Matsuka G. 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.
11. Yarmoluk S., Kovalska V., Kovtun Yu. 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.
12. Kumar C. V., Turner P. S., Asuncion E. H. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect // J. Photochem. Photobiol. A: Chem.—1993.—74.—P. 231—238.
13. Emerson E. S., Conlin M. A., Rosenoff A. E., Norland K., Rodriguez H., Chin D., Bird G. The geometrical structure and absorption spectrum of a cyanine dye aggregate // J. Phys. Chem.—1967.—71, N 8.—P. 2396—2403.

УДК 535.372

Надійшла до редакції 21.12.98