

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 22. Спектрально-люмінесцентні властивості монометинових пірилієвих і піридинових ціанінів та їхніх комплексів з ДНК

С. С. Лукашов, Г. О. Качковський¹, М. Ю. Лосицький¹, С. М. Ярмолюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
E-mail: otava@carrier.kiev.ua

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 62, Київ, 01033, Україна

Отримано низку пар структурно подібних монометинових ціанінових барвників з протилежним напрямком електричного диполя та досліджено їхні спектрально-люмінесцентні властивості у вільному стані та в присутності дволанцюгової ДНК. Зміна значень стоксових зсувів барвників при їхній взаємодії з ДНК свідчить про те, що барвники в комплексах оточені дипольним середовищем, що підтверджує «напівінтеркаляційну» модель взаємодії. Розглядаючи зміну стоксового зсуву барвників при взаємодії з ДНК як прояв зміни їхньої електронної асиметрії, висловлено припущення щодо положення кожного барвника в ДНК та зроблено висновок стосовно того, що орієнтацію молекули барвника в комплексі визначає в основному її геометрія, а напрямок дипольного моменту барвника має при цьому вторинне значення.

Вступ. Монометинові ціанінові барвники широко застосовуються як флуоресцентні зонди для визначення нуклеїнових кислот (НК) в різноманітних медичних та біологічних тестах і дослідах [1–3]. Принцип дії таких зондів полягає в тому, що, зв'язуючись з НК, молекула зонда жорстко фіксує свою конформацію. Це значно знижує ймовірність як її конформаційних переходів, так і коливальної дезактивації енергії електронного збудження, внаслідок чого інтенсивність випромінювання барвника значно зростає [4].

Взаємодія малих молекул, зокрема, барвників з ДНК досліджується, починаючи з 60-х років і до цього часу становить значний інтерес. Для ціанінів у літературі описано дві основні моделі взаємодії: інтеркаляційну [5–9] та борозенкову [8, 10, 11],

причому для монометинів більш прийнятною, як правило, є перша [7, 8]. Виходячи з того, що для кожного окремого барвника спосіб взаємодії з ДНК залежить від його структури та розподілу електронної густини, для монометинових ціанінів ми запропонували модель «напівінтеркаляції» барвника у дволанцюгові НК [12]. Нещодавно для низки монометинових ціанінових барвників нами було отримано експериментальні результати, що свідчать на користь «напівінтеркаляційної» взаємодії цих барвників з ДНК [13].

З метою детальнішого дослідження механізму взаємодії монометинових ціанінів з ДНК отримано низку пар структурно подібних барвників цього класу з протилежним напрямком електричного диполя та досліджено їхні спектрально-люмінесцентні властивості у вільному стані та в присутності дволанцюгової ДНК. Крім того, розглянуто вплив об'ємних замісників у гетерозалишках на зв'язування барвника з ДНК.

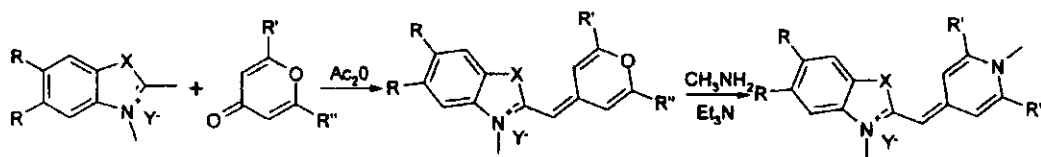


Схема синтезу барвників

Матеріали і методи. Барвники. Для отримання пірилієвих барвників четвертинні солі 2-метилзаміщених гетероциклів було конденсовано з відповідно 2,6-дизаміщеними γ -піронами в оцтовому ангідриді (схема). Піридинові барвники отримували з пірилієвих реакцією з надлишком метиламіну в спирті у присутності триетиламіну згідно із схемою [14].

При описанні спектрів ЯМР Н¹ використано наступні скорочення: с. — синглет; д. — дублет; д. д. — дублет дублетів; м. — нерозділений мультиплет; уш. с. — уширений синглет.

Пірилієві барвники. Суап 39: R = H; R' = CH₃; R'' = CH₃; X = S; Y = CH₃OSO₃⁻. 2-(2,6-диметил-4Н-4-піраніліденметил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій метилметосульфат. Вихід 56 %. T_{топл.} 283 °С. ЯМР Н¹: с. 2,37 (3Н), с. 2,48 (3Н), уш. с. 3,39 (3Н), с. 4,00 (3Н), с. 6,46 (1Н), с. 6,82 (1Н), с. 7,03 (1Н), д. д. 7,59 (1Н, 7,7 Гц, 9 Гц), д. д. 7,72 (1Н, 7,7 Гц, 8,6 Гц), д. 7,97 (1Н, 8,6 Гц), д. 8,14 (1Н, 9,0 Гц).

ООМе: R = H; R' = CH₃; R'' = CH₃; X = O; Y = Г. 2-(2,6-диметил-4Н-4-піраніліденметил)-3-метил-1,3-бензооксазол-3-ій йодметилат. Вихід 26 %. T_{топл.} 327 °С. ЯМР Н¹: с. 2,38 (3Н), с. 2,47 (3Н), уш. с. 3,83 (3Н), с. 5,92 (1Н), с. 6,77 (1Н), с. 7,52 (1Н), м. 7,56 (2Н), д. 7,78 (1Н, 8,0 Гц), д. 7,88 (1Н, 7,7 Гц).

Ме-dO 39: R,R = -CH₂-; R'' = CH₃; X = S; Y = CH₃OSO₃⁻. 6-(2,6-диметил-4Н-4-піраніліденметил)-7-метил-[1,3]-діоксо[4',5':4,5]-бензо-[d][1,3]-тіазол-7-ій метилметосульфат. Вихід 39 %. T_{топл.} 343 °С (розкл.). ЯМР Н¹: с. 2,31 (3Н), с. 2,42 (3Н), уш. с. 3,38 (3Н), с. 3,94 (3Н), с. 6,24 (2Н), с. 6,36 (1Н), с. 6,69 (1Н), с. 6,86 (1Н), с. 7,68 (1Н), с. 7,69 (1Н).

SOPh: R = H; R' = CH₃; R'' = C₆H₅; X = S; Y = Г. 3-метил-2-(2-метил-6-феніл-4Н-4-піраніліденметил)-1,3-бензотіазол-3-ій йодметилат. Вихід 63 %. T_{топл.} 336 °С (розкл.). ЯМР Н¹: с. 2,39 (3Н), с. 4,01 (3Н), с. 6,35 (1Н), с. 6,94 (1Н), д. 7,22 (2Н, 7,5 Гц), м. 7,39 (5Н), д. д. 7,57 (1Н, 7,2 Гц, 7,8 Гц), д. 7,81 (1Н, 7,8 Гц), д. 8,07 (1Н, 8,1 Гц).

SODPh: R = H; R' = C₆H₅; R'' = C₆H₅; X = S; Y = Г. 2-(2,6-дифеніл-4Н-4-піраніліденметил)-3-ме-

тил-1,3-бензотіазол-3-ій йодметилат. Вихід 48 %. T_{топл.} 321 °С. ЯМР Н¹: с. 4,21 (3Н), с. 6,02 (1Н), с. 7,14 (1Н), м. 7,36 (5Н), м. 7,45 (7Н), д. д. 7,63 (1Н, 7,6 Гц, 8,5 Гц), д. 7,85 (1Н, 8,5 Гц), д. 8,14 (1Н, 7,7 Гц).

Піридинові барвники. Суап 40: R = H; R' = CH₃; R'' = CH₃; X = S; Y = CH₃OSO₃⁻. 3-метил-2-(1,2,6-триметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-1,3-бензотіазол-3-ій метилметосульфат. Вихід 78 %. T_{топл.} 297 °С. ЯМР Н¹: 2,63 (6Н), с. 3,37 (3Н), с. 3,68 (3Н), с. 3,79 (3Н), с. 6,04 (1Н), с. 7,24 (2Н), д. д. 7,26 (1Н, 7,3 Гц, 9,5 Гц), м. 7,51 (2Н), д. 7,83 (1Н, 9,5 Гц).

ONMe: R = H; R' = CH₃; R'' = CH₃; X = O; Y = Г. 3-метил-2-(1,2,6-триметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-1,3-бензооксазол-3-ій йодметилат. Вихід 53 %. T_{топл.} 312 °С. ЯМР Н¹: 2,68 (6Н), с. 3,78 (3Н), с. 3,92 (3Н), с. 6,14 (1Н), с. 7,26 (2Н), д. д. 7,31 (1Н, 7,6 Гц, 8,0 Гц), д. д. 7,49 (1Н, 7,6 Гц, 8,1 Гц), д. 7,61 (1Н, 8,1 Гц), д. 7,68 (1Н, 8,0 Гц).

S-04 [13]: R,R = -CH₂-; R' = CH₃; R'' = CH₃; X = S; Y = CH₃OSO₃⁻. 7-метил-6-(1,2,6-триметил-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-[1,3]-діоксо[4',5':4,5]-бензо-[d]-[1,3]-тіазол-7-ій метилметосульфат. Вихід 56 %. T_{топл.} 360 °С (розкл.) (AcOH). ЯМР Н¹: с. 2,60 (6Н), с. 3,64 (3Н), с. 3,75 (3Н), с. 5,94 (1Н), с. 6,31 (2Н), с. 7,12 (2Н), с. 7,37 (1Н), с. 7,49 (1Н).

SNPh: R = H; R' = CH₃; R'' = C₆H₅; X = S; Y = Г. 2-(1,2-диметил-6-феніл-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій йодметилат. Вихід 83 %. T_{топл.} 326 °С. ЯМР Н¹: 2,67 (3Н), с. 3,53 (3Н), с. 3,91 (3Н), с. 5,92 (1Н), с. 7,17 (1Н), м. 7,29 (3Н), м. 7,37 (4Н), д. д. 7,51 (1Н, 7,5 Гц, 8,3 Гц), д. 7,69 (1Н, 8,3 Гц), д. 8,03 (1Н, 8,5 Гц).

SNDPh: R = H; R' = C₆H₅; R'' = C₆H₅; X = S; Y = Г. 3-метил-2-(1-метил-2,6-дифеніл-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-1,3-бензотіазол-3-ій йодметилат. Вихід 87 %. T_{топл.} 309 °С. ЯМР Н¹: с. 3,62 (3Н), с. 3,95 (3Н), с. 5,74 (1Н), с. 7,07 (2Н), м. 7,28 (4Н), м. 7,41 (7Н), д. д. 7,53 (1Н, 7,0 Гц, 8,1 Гц), д. 7,77 (1Н, 8,1 Гц), д. 7,95 (1Н, 8,3 Гц).

Використані речовини. Тотальну ДНК з ерит-

роцитів курчат («Sigma», США) було очищено згідно з [15]. Отриманий зразок містив дволанцюгові фрагменти довжиною до 10^3 пар основ.

Для приготування всіх водних розчинів у даній роботі використовували 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,5. Диметилформамід (ДМФА) було перегнано під зниженим тиском [16].

Розчини для спектральних досліджень. Використано стокові розчини барвників у ДМФА концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ М та розчин ДНК в буфері концентрації $6 \cdot 10^{-3}$ М пар основ ДНК.

Для отримання робочих розчинів стокові розчини відповідних речовин розводили в буфері до потрібної концентрації. Концентрація барвників у робочих розчинах становила 10^{-5} М. Для отримання комплексів барвників з ДНК стокові розчини барвників додавали до розчину ДНК у буфері концентрації $6 \cdot 10^{-5}$ моль пар основ/л. В отриманих розчинах співвідношення концентрацій пари основ ДНК:молекули барвника становило 6:1.

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра Spectord M 40 (Німеччина). Запис спектрів флуоресценції здійснювали на спектрофлюориметрі Hitachi Model 850 (Японія). Довжину хвилі збудження флуоресценції брали рівною довжині хвилі максимуму смуги поглинання мономерів барвника в даному розчині. Всі вимірювання проводили в кварцовій кюветі 1×1 см одразу після приготування розчинів при кімнатній температурі. Спектри ЯМР

^1H отримували на приладі «Varian VXR-300» (США) з робочою частотою 300 МГц і внутрішнім стандартом ТМС.

Результати і обговорення. Спектри поглинання барвників. Параметри спектрів поглинання розчинів досліджуваних барвників у ДМФА, водному розчині та в присутності ДНК представлено в таблиці.

Значення довжин хвиль максимумів поглинання барвників у буфері (λ_0^{ab}), в ДМФА ($\lambda_{\text{DMFA}}^{\text{ab}}$) та в присутності ДНК ($\lambda_{\text{DNA}}^{\text{ab}}$) лежать в інтервалі 408—508 нм. Значення молярних коефіцієнтів екстинкції розчинів барвників у буфері (ϵ_0), в ДМФА (ϵ_{DMFA}) та в присутності ДНК (ϵ_{DNA}) знаходяться в межах $3,15 \cdot 10^4$ — $9,6 \cdot 10^4$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. За формою спектрів барвники поділяються на дві групи. В спектрах усіх барвників з пірилієвим ядром (Суап 39, SOPh, SOdPh, OOMe та Me-dO39) спостерігаються два максимуми, що відповідають переходам на різні коливальні рівні збудженого стану відповідних барвників (рис. 1), тоді як усі спектри поглинання барвників, що містять піридиновий залишок (Суап 40, S-04, SNPh, SNdPh та ONMe), складаються з однієї смуги (рис. 2), яка явно вирізняється.

При переході від водного середовища до ДМФА в спектрах усіх барвників спостерігається довгохвильовий зсув максимуму поглинання $\lambda_{\text{DMFA}}^{\text{ab}}$ відносно λ_0^{ab} в межах 4—12 нм (таблиця) внаслідок зменшення нуклеофільності середовища. Такий же зсув від 2 до 18 нм має місце й у водному розчині

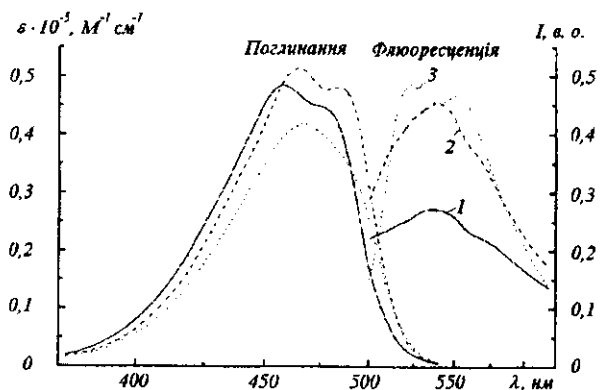


Рис. 1. Спектри поглинання та флуоресценції барвника SOPh у вільному стані в буфері (1) і в ДМФА (2), а також комплексів SOPh з ДНК (3). Інтенсивність спектрів флуоресценції наведено у відносних одиницях. Спектри флуоресценції 1 і 2 збільшено в 10 разів

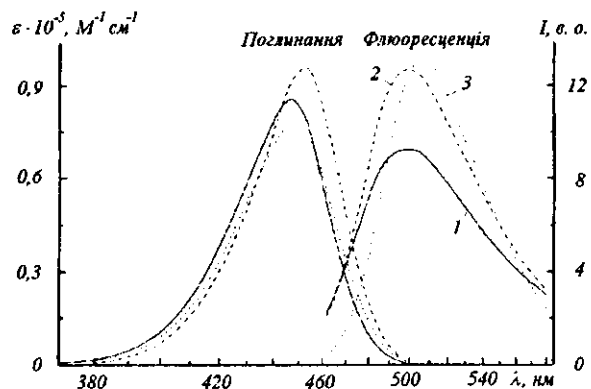


Рис. 2. Спектри поглинання та флуоресценції барвника SNPh у вільному стані в буфері (1) і в ДМФА (2), а також комплексів SNPh з ДНК (3). Інтенсивність спектрів флуоресценції наведено у відносних одиницях. Спектри флуоресценції 1 і 2 збільшено в 50 разів

Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у воді, ДМФА та в присутності ДНК

Барвник	λ_0^{ab} , нм	λ_{DMFA}^{ab} , нм	λ_{DNA}^{ab} , нм	$\epsilon_0 \cdot 10^3$, $M^{-1} cm^{-1}$	$\epsilon_{DMFA} \cdot 10^3$, $M^{-1} cm^{-1}$	$\epsilon_{DNA} \cdot 10^3$, $M^{-1} cm^{-1}$	λ_0^{Π} , нм	λ_{DMFA}^{Π} , нм
Суан 40	435	440	439	54	59	47	474	478
SNPh	446	452	448	86	96	78	500	500
SNdPh	459	463	459	76	86	73	520	520
Суан 39	435, 457	439, 461	(433) 457	47, 55	48, 55	(40) 48,5	500	495
SOPh	458 (483)	464, 486	467 (495)	49 (43)	52, 48	42 (30)	540	540
SOdPh	469 (508)	481, 508	487, 521	33 (22)	45; 41,5	31,5; 27	615	535, 570
ONMe	408	413	410	81	90	75	447	450
OOMe	412, 430	416, 437	412, 430	62; 57,5	62, 57	61; 57,5	472	480
S-04	456	463	461	53,5	65	47	511	514
Me-dO39	457	463 (488)	461	49	50,5 (43)	46	545	549

Барвник	λ_{DNA}^{Π} , нм	ΔS_0 , нм	ΔS_{DMFA} , нм	ΔS_{DNA} , нм	I_0 , відн. од.	I_{DMFA} , відн. од.	I_{DNA} , відн. од.	I_{DNA}/I_0
Суан 40	479	39	38	40	0,174	0,25	44,8	257
SNPh	508	54	48	60	0,19	0,26	13,6	71,6
SNdPh	532	61	57	73	0,17	0,26	4,3	25,3
Суан 39	490	43	34	33	0,03	0,038	0,3	10
SOPh	523, 553	82	76	56	0,028	0,047	0,5	17,9
SOdPh	547, 580	146	89, 27	93, 26	0,044	0,04; 0,044	0,247; 0,24	5,6
ONMe	451	39	37	41	0,74	1,16	59,3	80,1
OOMe	465	32	43	35	0,08	0,1	0,452	5,65
S-04	514	55	51	53	0,01	0,16	6,14	61,4
Me-dO39	530	88	86	69	0,026	0,036	0,345	13,3

в присутності ДНК для всіх барвників, крім SNdPh, Суан 39 та OOMe (для цих барвників λ_{DNA}^{ab} рівна λ_0^{ab}).

Слід зазначити, що для всіх піридинових барвників форма спектра поглинання як у буфері, так і в ДМФА та в присутності ДНК однакова, а зсув λ_{DNA}^{ab} відносно λ_0^{ab} завжди менший за зсув λ_{DMFA}^{ab} відносно λ_0^{ab} . Щодо пірлієвих барвників, то для них подібної кореляції зсувів довжин хвиль не спостерігається.

Спектри випромінювання барвників. У таблиці також представлено параметри спектрів випромінювання розчинів барвників у ДМФА, в буфері та в присутності ДНК.

Значення довжин хвиль максимумів випромі-

нювання барвників у буфері (λ_0^{Π}), в ДМФА (λ_{DMFA}^{Π}) та в присутності ДНК (λ_{DNA}^{Π}) лежать в інтервалі 447—615 нм. Стоксові зсуви барвників у буфері (ΔS_0), в ДМФА (ΔS_{DMFA}) та в присутності ДНК (ΔS_{DNA}) мають значення від 26 до 146 нм.

Форми спектрів випромінювання піридинових барвників у буфері, в ДМФА та в присутності ДНК однакові, причому ці спектри дзеркально-симетричні відповідним спектрам поглинання (рис. 2). Для пірлієвих барвників Суан 39, SOPh, OOMe та Me-dO39 форми спектрів випромінювання їхніх розчинів у ДМФА та в буфері схожі, тоді як спектри цих барвників у присутності ДНК відрізняються за формою (рис. 1). Відповідні спектри поглинання та флуоресценції цих барвників досить

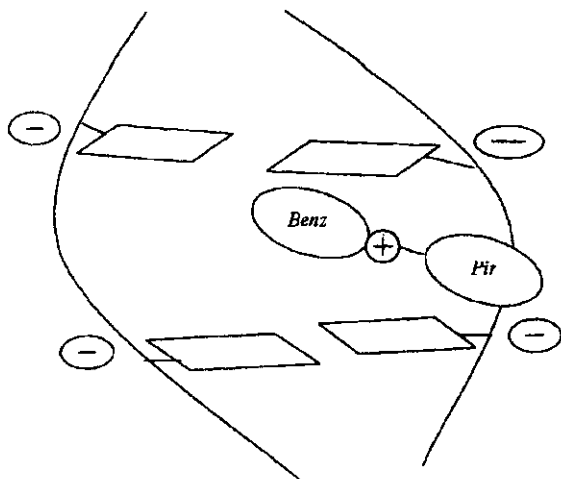


Рис. 3. Схематичне пояснення моделі «напівінтеркаляції» досліджуваних барвників у ДНК: бензотіазольний та бензооксазольний залишки (*Benz*) знаходяться між парами основ ДНК, тоді як залишки, що містять пірилії та піридин (*Pir*), розташовані в борозенці біля фосфатів. Для досліджуваних барвників таке розташування має місце незалежно від того, на який із залишків зміщений позитивний заряд барвника

часто не є дзеркально-симетричними (спектри Суап 39 у буфері та в ДМФА, спектри Me-dO39 у присутності ДНК, спектри SOPh у ДМФА та в присутності ДНК і всі спектри OOMe). Для барвника SOdPh форма спектра флюоресценції розчину в буфері відрізняється від форми спектра барвника як у ДМФА, так і в присутності ДНК. Спектри поглинання та флюоресценції SOdPh у буфері дзеркально-симетричні, але стоксів зсув становить 146 нм, що свідчить про сильний взаємний зсув гіперповерхонь потенціальної енергії основного та збудженого електронних станів.

Інтенсивність випромінювання барвників у вільному стані має однаково невисокі значення як у воді (I_0), так і в ДМФА (I_{DMFA}) (0,026—0,26 відносних одиниць (в. о.)), причому для пірилієвих барвників Суап 39, SOPh, SOdPh та Me-dO39, котрі, як відомо [17], через електронні особливості пірилієвого ядра випромінюють менше за відповідні піридинові барвники, інтенсивність ледь перевищує рівень фону (I_0 та I_{DMFA} складають 0,026—0,047 в. о.). Барвники ONMe та OOMe мають вищі значення I_0 та I_{DMFA} (таблиця), що обумовлено, насамперед, меншими просторовими ускладненнями для утворення планарної конформації, бо бензооксазольний залишок, який входить до складу цих барвників, має менші розміри, ніж бензотіазольний,

оскільки атом кисню є помітно меншим за атом сірки.

У присутності ДНК інтенсивність випромінювання усіх барвників (I_{DNA}) зростає відносно I_0 , причому величина зростання I_{DNA}/I_0 є значно більшою для піридинових барвників (25,3—257), ніж для пірилієвих (5,6—17,9) (таблиця). Звертає увагу значне зростання інтенсивності для барвника SNPh (у 71,6 разу) і, особливо, для SNdPh (у 25,3 разу), які через присутність об'ємних фенільних радикалів не можуть утворювати інтеркаляційних комплексів шляхом повної інтеркаляції. Малоімовірним також є зв'язування цих барвників малою борозенкою ДНК, оскільки таким чином, як правило, фіксуються видовжені голкоподібні молекули. Отже, «напівінтеркаляція» видається найвірогіднішим варіантом структури комплексів SNPh та SNdPh з ДНК.

Взаємодія барвників з ДНК та її вплив на електронну асиметрію молекул барвників. Важливим як з практичної, так і з теоретичної точки зору є розуміння механізму взаємодії зонда з молекулою ДНК. Залежно від своєї структури барвник може інтеркалювати в ДНК (вбудовуватися між сусідніми парами основ) або ж розташовуватися в борозенці ДНК. Для монометинових ціанінових барвників, молекули яких відносно невеликі, а сумарний позитивний заряд зміщений до одного з гетероциклічних залишків, нами було запропоновано модель «напівінтеркаляції» в дволанцюговій НК [12]. Відповідно до цієї моделі, одне з ядер барвника інтеркалює між парами основ, а інше, завдяки електростатичній взаємодії з негативно зарядженим фосфатним іоном НК, зміщене до борозенки (рис. 3).

Оскільки нуклеотидні основи ДНК є електрично нейтральними, а фосфатні групи — негативно зарядженими, то саме при «напівінтеркаляції» в ДНК молекула барвника потрапляє у чітко виражене дипольне середовище (при повній інтеркаляції молекула барвника повністю знаходиться між електрично нейтральними нуклеотидними основами, а при заляганні в борозенку декілька негативних зарядів фосфатних груп рівномірно розміщені вздовж молекули барвника і в сумі не дають значного дипольного моменту). Внаслідок впливу цього середовища на електронну структуру барвника основність неінтеркалюючого ядра збільшується.

Для ціанінів при зростанні електронної асиметрії молекули барвника підвищується і значення стоксового зсуву ΔS [17], так що ΔS можна наближено вважати мірою електронної асиметрії. З даних таблиці видно, що величина стоксових зсувів при утворенні комплексу з ДНК зростає у випадку

барвників Суан 40, SNPh, SNdPh, ONMe і OOMe, а у випадку барвників Суан 39, SOPh, SOdPh, S-04 та Me-dO39, навпаки, зменшується. Така зміна стоксового зсуву свідчить на користь взаємодії барвника з ДНК саме «напівінтеркаляційним» шляхом.

Можна запропонувати наступне пояснення спостережених змін стоксового зсуву. У барвниках Суан 40, SNPh, SNdPh і ONMe піридинове ядро є більш основним. Оскільки зростання стоксового зсуву є проявом підвищення електронної асиметрії, то в цих барвниках при напівінтеркаляції основність піридинового ядра зростає ще більше. Отже, в комплексі з ДНК саме піридинове ядро знаходиться біля фосфатних іонів, а бензотіазольне та бензооксазолне ядра інтеркалюють між парами основ ДНК. У випадку барвників Суан 39, SOPh, SOdPh та Me-dO39 стоксів зсув, навпаки, зменшується. Спостерігається більша величина зміни (10—53 нм), що відповідає більшій різниці основностей між пірилієвим та бензотіазольним ядрами. Оскільки напрямком зміни електронної асиметрії для пірилієвих і піридинових барвників протилежний, то зменшення стоксових зсувів для перших свідчить про їхнє розміщення в ДНК-комплексі аналогічно останнім (рис. 3).

Бензооксазолне ядро барвника OOMe менш основне за пірилієве, тому при інтеркаляції бензооксазолним ядром стоксів зсув барвника в комплексі має бути більшим, ніж у вільному стані, що й спостерігається. Діоксиметиленове угруповання підвищує основність бензотіазольного ядра практично до рівня піридинового, тому для барвника S-04 і спостерігаємо невелике зменшення ΔS .

Зміну стоксового зсуву в рядах при заміщенні метильних груп на фенільні також можна пояснити зміною основності піридинового ядра. Для барвників Суан 40, SNPh і SNdPh введення фенільних замісників підвищує їхню основність, що супроводжується зменшенням заряду на інтеркальованому бензотіазольному ядрі в основному стані. Це призводить до асиметризації молекули і відповідно до зростання величини стоксового зсуву в ряду Суан 40, SNPh і SNdPh.

Висновки. Отримано нові експериментальні свідчення на користь «напівінтеркаляційної» моделі взаємодії монометинових ціанінів з ДНК. Так, барвники SNPh і SNdPh містять у піридиновому ядрі об'ємні фенільні радикали, які виключають можливість інтеркаляції цим ядром. Однак взаємодія цих барвників з ДНК викликає підвищення інтенсивності флуоресценції відповідно в 71,6 та 25,3 рази, що є характерним для інтеркаляційної взаємодії.

Зміна значень стоксових зсувів при взаємодії з ДНК свідчить про перебування барвників у комплексах у дипольному середовищі, що також підтверджує «напівінтеркаляційну» модель взаємодії. Орієнтацію молекули барвника в комплексі визначає її геометрія, напрямком дипольного моменту барвника при цьому має вторинне значення. Пірилієві і піридинові барвники, близькі за формою, але протилежні за напрямком електронної асиметрії, розташовані в комплексах згідно з геометрією їхніх молекул, тобто таким чином, що бензооксазолні та бензотіазольні ядра розташовані між парами основ ДНК, а пірилієві та піридинові залишки знаходяться в борозенковому просторі.

S. S. Lukashov, G. O. Kachkovskyy, M. Yu. Losytskyu, S. M. Yarmoluk.

Interaction of cyanine dyes with nucleic acids.

22. Spectral-luminescent properties of monomethyne pyrylium and pyrimidinium cyanines and their DNA-complexes

Summary

We have obtained a number of pairs of monomethyne cyanines, dyes of each pair having similar structure and contrary direction of electric dipole moment, and investigated the spectral-luminescent properties of these dyes in free state and in the presence of double-stranded DNA. The change in values of the dyes Stokes shifts under the interaction with DNA is the evidence for the location of the dyes within DNA complexes in dipole medium, that confirms the «half-intercalation» interaction model. Considering the changes of the dyes Stokes shifts under the interaction with DNA as the manifestation of changes in electronic asymmetry of these dyes, we made an assumption about the location of each dye inside the DNA. It has been concluded, that the dye molecule orientation in the DNA-complex is defined by the dye geometry, its dipole moment direction being of minor importance.

С. С. Лукашов, Г. А. Качковский, М. Ю. Лосицкий, С. Н. Ярмолук.

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. 22. Спектрально-люминесцентные свойства монометиновых пирилиевых и пиридиновых цианинов и их комплексов с ДНК

Резюме

Получен ряд пар структурно подобных монометиновых цианиновых красителей с противоположным направлением электрического диполя и исследованы их спектрально-люминесцентные свойства в свободном состоянии и в присутствии двухцепочечной ДНК. Изменение значений стоксовых сдвигов красителей при их взаимодействии с ДНК свидетельствует о пребывании красителей в комплексах в дипольной среде, что подтверждает «полуинтеркаляционную» модель взаимодействия. Рассматривая изменение стоксового сдвига красителей при взаимодействии с ДНК как проявление изменения их электронной асимметрии, было высказано предположение о положении каждого красителя в ДНК и сделан вывод о том, что ориентацию молекулы красителя в комплексе определяет ее геометрия, а направление дипольного момента красителя имеет второстепенное значение.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
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 1 // *Anal. Biochem.*—1995.—231.—P. 359—365.
3. Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K. DNA staining for fluorescent and laser confocal microscopy // *Histochem. and Cytochem.*—1997.—45, N 1.—P. 49—53.
4. Огульчанський Т. Ю., Яцук В. М., Ярмолюк С. М., Лосицький М. Ю. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 14. Деякі спектральні особливості монометинових бензотіазолових ціанінових барвників та їхньої взаємодії з ДНК // *Біополімери і клітина.*—2000.—16, № 5.—С. 345—355.
5. Lerman L. S. The structure of the DNA-acridine complex // *Biochemistry.*—1963.—49.—P. 94—102.
6. Pritchard N. J., Blake A., Peacocke A. R. Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA // *Nature.*—1966.—212.—P. 1360—1361.
7. 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.
8. Norden B., Tjernelid F. Optical studies on complexes between DNA and pseudoisocyanine // *Biophys. Chem.*—1977.—6.—P. 31—45.
9. Long E. C., Barton J. K. On demonstrating DNA intercalation // *Accounts Chem. Res.*—1990.—23, N 9.—P. 271—273.
10. Kumar C. V., Turner R. S., Asuncion E. H. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect // *J. Photochem. and Photobiol. A: Chem.*—1993.—74.—P. 231—238.
11. Milanovich N., Sun M., Jankowiak R., Small G. J., Hayes J. M. Binding of TO-PRO-3 and TOTO-3 to DNA: Fluorescence and hole-burning studies // *J. Phys. Chem.*—1996.—100, N 21.—P. 9181—9186.
12. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Kovtun Y. P. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 5. Towards model of «half-intercalation» of monomethylene cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // *Біополімери і клітина.*—1999.—15, № 1.—P. 75—82.
13. Лукашов С. С., Лосицький М. Ю., Ярмолюк С. М., Сломінський Ю. Л. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 12. Нові монометинові ціаніни на основі 5,6-метилендіоксибензотіазолу та спектрально-люмінесцентні властивості їхніх комплексів з нуклеїновими кислотами // *Біополімери і клітина.*—2000.—16, № 6.—С. 562—572.
14. Kelemen J., Wizinger R. Uber alkylsubstituierte Pyrylo- und Pyridino-cyanine 1. 2,6-Dimethylpyrylo- und 2,6-Dimethylpyridino-cyanine aus 2,6-Dimethyl-i-pyron // *Helv. chim. acta.*—1962.—5.—S. 1908—1917.
15. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.—458 p.
16. *Органикум* / Пер. с нем.—М.: Мир, 1992.—Т. 2.—474 с.
17. Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей.—Киев: Наук. думка, 1994.—232 с.

УДК 535.372

Надійшла до редакції 25.04.2000