

Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. Мезо-заміщені триметинціанінові барвники для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот

С. С. Лукашов, М. Ю. Лосицький, Ю. П. Ковтун¹, С. М. Ярмолюк

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

¹Інститут органічної хімії НАН України
Вул. Мурманська, 5, Київ, 02094, Україна

Синтезовано низку нових симетричних і несиметричних триметинцианінів з різноманітними замісниками у мезо-положенні поліметинового ланцюга. У присутності ДНК, РНК і в меншій мірі в присутності білка інтенсивність флуоресценції барвників зростає. Максимальне зростання становить 270 разів. Найбільші його значення спостерігаються для барвників з метильною групою в мезо-положенні поліметинового ланцюга. Якщо більш масивні групи — ароматичні чи трет-алкільний залишки — з'єднані з мезо-положенням гнучким аліфатичним ланцюгом з 1–3 СН₂ груп, то флуоресцентні властивості таких барвників за присутності нуклеїнових кислот близькі до властивостей мезо-метил-заміщених барвників.

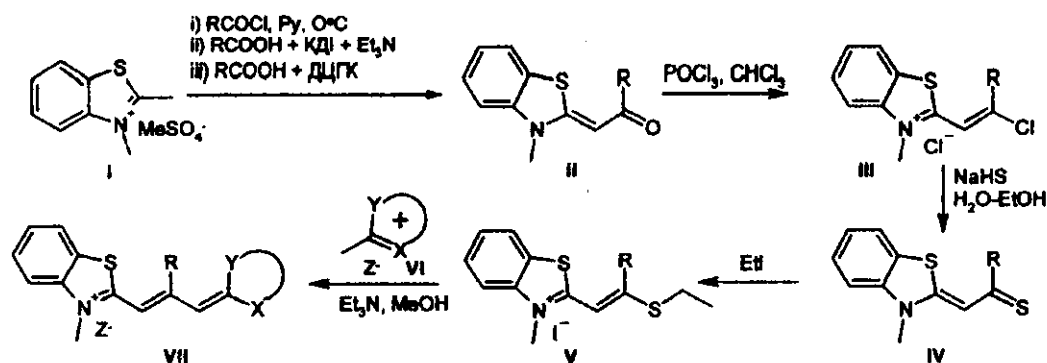
Вступ. Останнім часом для детекції нуклеїнових кислот (НК) використовуються флуоресцентні зонди на основі ціанінових барвників [1, 2]. Перевагою таких зондів є притаманна лише ціаніновим барвникам здатність при зв'язуванні з НК у 10–1000 разів підвищувати квантовий вихід флуоресценції [1, 3]. За таких умов реальною стає детекція НК в розчині [1, 4, 5].

Ширше застосування здобули зонди — похідні монометинцианінів. Ці барвники мають вузькі смуги поглинання в області 400–550 нм. Як зонди, смуги поглинання яких знаходяться в інтервалі 500–650 нм, нами запропоновано триметинцианіни з замісниками у поліметиновому ланцюзі [6]. У присутності НК було визначено флуоресцентні властивості 1) низки похідних тіакарбоціанініюдиду з алкільними замісниками в мезо-положенні поліметинового ланцюга [7]; 2) низки мезо-метил-заміщених симетричних триметинцианінів з різними гетероциклічними залишками [8]. При зв'язуванні

отриманих барвників як з ДНК, так і з РНК спостерігалася зростання інтенсивності флуоресценції до 100 разів.

В даній роботі синтезовано низку нових симетричних і несиметричних триметинцианінів з різноманітними групами в мезо-положенні поліметинового ланцюга. Спектрально-люмінесцентні властивості отриманих барвників охарактеризовано у вільному стані та в присутності ДНК, РНК і бичачого сироваткового альбуміну — БСА.

Матеріали і методи. Барвники синтезували (схема) через ацилтіометиленові похідні 2-метил-бензотіазолу [9]. Метилметосульфат 2,3-диметил-бензотіазолія I ацилювали хлорангідридами відповідних кислот у піридиновому розчині при $t = 0$ °С. Отримані в такий спосіб ацилметиленові основи II дією POCl₃ в хлороформі перетворювали на β-хлорвінільні похідні III, з яких дією надлишку водно-спиртового розчину NaHS отримували ацилтіометиленові основи IV. Алкілювання інтермедіатів IV йодистим етилом залежно від розчинності IV в середовищі хлороформу чи диметилсульфоксиду (ДМСО) давало етилтіонієві солі V, які вводили в



Синтез барвників

реакцію з четвертинними солями VI в метанолі за присутності триетиламіну (схема).

Для ацилювання солі 2,3-диметилбензотіазолі в даній роботі вперше застосовано конденсуючі агенти пептидного синтезу N,N'-дициклогексилкарбодіімід (ДЦГК) та 1,1'-карбонілдіімідазол (КДІ). Ацилметилєнові похідні II з високими виходами отримано з низки кислот — метоксиоцтової, 2-тетрагідрофуранкарбонової, індолілоцтової, α -нафтілоцтової, хлорангідриди яких при утворенні осмолюються. У присутності КДІ конденсація проходить протягом години при кімнатній температурі з майже кількісним виходом. Провести в подібних умовах конденсацію карбонової кислоти з двома еквівалентами метилбензотіазолієвої солі з утворенням мезо-заміщеного триметинціаніну в одну стадію не вдалося. Метоксиацетил-метилєнбензотіазол у присутності ДЦГК чи КДІ та триетиламіну не вступав у реакцію з метилбензотіазолієвою сіллю при 30-хв кип'ятінні в ДМСО.

1-(3-метил-2, 3-дигідро-1, 3-бензотіазол-2-іден)метил кетони (II). М е т о д А. До охолодження до $t = 0^\circ\text{C}$ суспензії 5 г (0,018 моль) метилметосульфату 2,3-диметилбензотіазолі в 15 мл сухого піридину при інтенсивному перемішуванні протягом 5 хв порціями додавали 0,015 моль хлорангідриду відповідної кислоти або його розчину в мінімальній кількості діоксану. Через 15 хв охолодження припиняли і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі ще протягом 1 год. Піридин упарювали під зниженим тиском, темний залишок кристалізували з водного спирту, маслоподібні продукти екстрагували хлороформом. Вихід 26—80 %.

М е т о д Б. 0,010 моль карбонової кислоти, 3 г (0,015 моль) КДІ та 1,5 мл (0,011 моль) триетиламіну перемішували протягом 15 хв у 10 мл диметилформаліду (ДМФА). За цей час виділення вуглекислого газу припинялося. До суміші додавали 3 г (0,011 моль) метилметосульфату 2,3-

диметилбензотіазолі, реакційну суміш перемішували впродовж 0,5—2 год при температурі 30—50 $^\circ\text{C}$. Після охолодження додавали 5-кратний об'єм води і продукт реакції відфільтровували чи екстрагували хлороформом. Вихід 45—96 %.

2-(2-етилтіо-2-R-вініл)-3-метил-d-бензо-1, 3-тіазолій йодиди (III). 0,010 ммоль II розчиняли в хлороформі, додавали 0,5—1 мл (0,0055—0,011 моль) хлорокису фосфору і кип'ятили протягом 0,5—2 год. У випадку $R = \text{CF}_3$ III отримували при 6-год кип'ятінні відповідної II в чистому хлорокисі, а у випадку $R = \text{CCl}_3$ за подібних умов отримати хлорвінільне і наступні похідні не вдалося. Хлороформ далі упарювали у вакуумі. Залишок розтирали під 20—40 мл 1,0 М водного розчину NaHS, підтримуючи лужне середовище та при поганому розчиненні залишку додаючи достатню кількість спирту. При цьому продукти IV випадали у вигляді темно-червоних чи брунатних осадів. Маслоподібні IV екстрагували хлороформом. Хлороформовий розчин перемішували протягом 1 год під розчином NaHS, слідкуючи за лужною реакцією останнього, упарювали всю суміш, обробляли залишок водою і фільтрували (екстрагували хлороформом) темні продукти IV. 0,33 г висушених IV розчиняли в 1—10 мл хлороформу чи ДМСО, додавали 1—1,5 еквівалента йодистого етилу і реакційну суміш залишали на 1 год чи нагрівали протягом 5—20 хв при 60 $^\circ\text{C}$. Хлороформ упарювали у вакуумі, отримані V використовували в наступній стадії без очищення.

Барвники VII. До розчину 0,001 моль V та 0,001 моль VI у 5—20 мл метанолу додавали 0,15 мл (0,0011 моль) триетиламіну. Суміш кип'ятили 15 хв. Осад барвника відфільтровували після охолодження. Отримали:

L-1. Вихід 88 %. $T_{\text{топл}}$ 164 $^\circ\text{C}$. ЯМР Н¹: с. 3,80 (6H), с. 3,92 (9H), с. 6,72 (2H), уш. с. 6,95 (2H), д. д. 7,32 (2H, 7,2 Гц, 7,8 Гц), д. д. 7,53 (2H, 7,2 Гц, 8,2 Гц), д. 7,70 (2H, 8,2 Гц), м. 7,79 (2H).

L-3. Вихід 66 %. $T_{\text{топл}}$ 187 °С. ЯМР H^1 : с. 3,98 (6H), уш. с. 6,99 (2H), м. 6,92 (1H), уш. м. 7,21 (1H), д. д. 7,39 (2H, 7,6 Гц, 8,3 Гц), д. д. 7,59 (2H, 7,6 Гц, 7,9 Гц), д. 7,79 (2H, 8,3 Гц), д. 7,90 (2H, 7,9 Гц), уш. с. 8,18 (1H).

L-4. Вихід 52 %. $T_{\text{топл}}$ 196 °С. ЯМР H^1 : м. 2,17 (2H), т. 3,09 (2H, 7,8 Гц), с. 3,91 (6H), т. 4,27 (2H, 6,3 Гц), с. 6,46 (2H), д. 7,05 (2H, 8,0 Гц), м. 7,32 (3H), д. д. 7,40 (2H, 7,8 Гц, 8,4 Гц), д. д. 7,64 (2H, 7,8 Гц, 7,9 Гц), д. 7,84 (2H, 8,4 Гц), д. 8,03 (2H, 7,9 Гц).

L-6. Вихід 66 %. $T_{\text{топл}}$ 263 °С — розкл. ЯМР H^1 : с. 1,21 (9H), с. 2,89 (2H), с. 3,96 (6H), с. 6,30 (2H), д. д. 7,45 (2H, 7,4 Гц, 7,9 Гц), д. д. 7,64 (2H, 7,4 Гц, 8,5 Гц), д. 7,85 (2H, 8,5 Гц), д. 8,04 (2H, 7,9 Гц).

L-7. Вихід 50 %. $T_{\text{топл}}$ 278 °С. ЯМР H^1 : т. 3,03 (2H, 7,8 Гц), т. 3,11 (2H, 7,8 Гц), с. 3,95 (6H), с. 6,46 (2H), м. 7,19 (1H), м. 7,28 (4H), д. д. 7,49 (2H, 7,6 Гц, 8,2 Гц), д. д. 7,65 (2H, 7,6 Гц, 8,1 Гц), д. 7,86 (2H, 8,2 Гц), д. 8,10 (2H, 8,1 Гц).

L-8. Вихід 33 %. $T_{\text{топл}}$ 272 °С — розкл. ЯМР H^1 : с. 3,94 (6H), с. 4,39 (2H), уш. с. 6,64 (2H), м. 7,29 (1H), м. 7,37 (4H), д. д. 7,43 (2H, 7,3 Гц, 8,4 Гц), д. д. 7,63 (2H, 7,3 Гц, 8,1 Гц), д. 7,83 (2H, 8,4 Гц), д. 8,02 (2H, 8,1 Гц).

L-9. Вихід 74 %. $T_{\text{топл}}$ 238 °С. ЯМР H^1 : с. 3,95 (6H), уш. с. 7,07 (2H), т. 7,34 (2H, 7,4 Гц), м. 7,57 (3H), м. 7,65 (3H), м. 7,89 (4H), с. 8,46 (1H).

L-10. Вихід 22 %. $T_{\text{топл}}$ 214 °С. ЯМР H^1 : с. 4,09 (6H), с. 6,52 (2H), д. д. 7,48 (2H, 8,0 Гц, 8,4 Гц), д. д. 7,68 (2H, 8,4 Гц, 8,4 Гц), д. 7,97 (2H, 8,0 Гц), д. 8,00 (2H, 8,4 Гц).

L-11. Вихід 73 %. $T_{\text{топл}}$ 228 °С. ЯМР H^1 : с. 3,93 (6H), уш. с. 6,91 (2H), т. 7,34 (2H, 7,6 Гц), т. 7,57 (2H, 7,7 Гц), м. 7,80 (6H), уш. с. 8,98 (2H).

L-12. Вихід 13 %. $T_{\text{топл}}$ 176 °С. ЯМР H^1 : м. 1,82 (2H), м. 2,08 (2H), м. 3,06 (2H), уш. с. 3,81 (7H), уш. с. 6,53 (2H), д. д. 7,37 (2H, 7,4 Гц, 7,8 Гц), д. д. 7,54 (2H, 7,4 Гц, 8,3 Гц), д. 7,71 (2H, 8,3 Гц), д. 7,96 (2H, 7,8 Гц).

L-13. Вихід 42 %. $T_{\text{топл}}$ 241 °С. ЯМР H^1 : с. 3,98 (6H), с. 5,29 (2H), с. 6,56 (2H), д. 6,98 (1H, 9,2 Гц), д. д. 7,19 (1H, 2,6 Гц, 9,2 Гц), д. 7,36 (1H, 2,6 Гц), д. д. 7,45 (2H, 7,4 Гц, 8,1 Гц), д. д. 7,64 (2H, 7,4 Гц, 8,4 Гц), д. 7,87 (2H, 8,4 Гц), д. 8,08 (2H, 8,1 Гц).

L-14. Вихід 40 %. $T_{\text{топл}}$ 172 °С. ЯМР H^1 : с. 3,90 (6H), с. 4,76 (2H), уш. с. 6,72 (2H), с. 7,25 (1H, 7,5 Гц), м. 7,54 (7H), м. 7,90 (6H), м. 8,27 (1H).

L-15. Вихід 73 %. $T_{\text{топл}}$ 283 °С — розкл. ЯМР H^1 : с. 3,93 (6H), уш. с. 6,87 (2H), д. д. 7,39 (2H, 7,6 Гц, 7,7 Гц), д. д. 7,59 (2H, 7,6 Гц, 8,2 Гц), м. 7,76 (6H), т. 8,17 (1H, 7,7 Гц), уш. с. 8,99 (1H).

L-17. Вихід 80 %. $T_{\text{топл}}$ 212 °С. ЯМР H^1 : с. 3,92 (6H), уш. с. 7,05 (2H), д. д. 7,33 (2H, 7,2 Гц, 7,8 Гц), м. 7,53 (3H), м. 7,75 (5H), уш. с. 8,22 (1H).

L-19. Вихід 65 %. $T_{\text{топл}}$ 166 °С. ЯМР H^1 : с. 3,93 (6H), уш. с. 7,05 (2H), т. 7,30 (2H, 7,3 Гц), т. 7,53 (2H, 7,8 Гц), м. 7,74 (5H), м. 7,93 (1H), уш. с. 8,66 (1H), м. 9,02 (1H).

L-20. Вихід 83 %. $T_{\text{топл}}$ 294 °С. ЯМР H^1 : с. 2,39 (3H), с. 3,69 (3H), с. 3,71 (3H), с. 3,77 (3H), уш. с. 6,10 (1H), уш. с. 6,16 (1H), д. д. 6,98 (1H, 2,3 Гц, 9,1 Гц), д. д. 7,22 (1H, 7,3 Гц, 8,0 Гц), д. д. 7,42 (1H, 7,3 Гц, 9,1 Гц), д. 7,92 (1H, 2,3 Гц), д. 7,55 (2H, 9,1 Гц), д. 7,84 (1H, 8,0 Гц).

L-21. Вихід 47 %. $T_{\text{топл}}$ 235 °С. ЯМР H^1 : с. 2,53 (3H), с. 3,82 (3H), с. 4,35 (3H), с. 6,37 (1H), с. 6,52 (1H), т. 7,32 (1H, 7,6 Гц), т. 7,53 (1H, 7,7 Гц), т. 7,70 (2H, 8,3 Гц), д. 7,92 (1H, 8,8 Гц), д. 7,95 (1H, 7,9 Гц), д. 8,03 (1H, 8,4 Гц), д. 8,07 (1H, 8,7 Гц), д. 8,66 (1H, 8,6 Гц).

L-23. Вихід 59 %. $T_{\text{топл}}$ 325 °С — розкл. ЯМР H^1 : с. 2,56 (3H), с. 3,91 (3H), с. 3,94 (3H), с. 6,48 (1H), с. 6,68 (1H), т. 7,35 (1H, 7,6 Гц), т. 7,45 (1H, 7,7 Гц), т. 7,58 (1H, 7,8 Гц), т. 7,63 (1H, 7,7 Гц), д. 7,80 (1H, 8,3 Гц), д. 7,84 (1H, 8,5 Гц), д. 8,07 (1H, 7,9 Гц), д. 8,14 (1H, 7,7 Гц).

L-24. Вихід 38 %. $T_{\text{топл}}$ 259 °С. ЯМР H^1 : с. 2,55 (3H), с. 3,73 (3H), с. 4,21 (3H), с. 6,42 (1H), с. 7,00 (1H), т. 7,25 (1H, 7,5 Гц), т. 7,48 (1H, 7,8 Гц), д. 7,55 (1H, 8,1 Гц), д. 7,63 (1H, 7,1 Гц), т. 7,79 (1H, 7,7 Гц), д. 7,85 (1H, 7,8 Гц), м. 8,07 (2H), м. 8,52 (2H).

L-26. Вихід 39 %. $T_{\text{топл}}$ 257 °С. ЯМР H^1 : с. 1,28 (18H), с. 2,56 (3H), с. 4,07 (3H), с. 6,18 (1H), уш. с. 6,45 (1H), уш. с. 6,78 (2H), д. д. 7,60 (1H, 7,0 Гц, 8,0 Гц), д. д. 7,75 (1H, 7,0 Гц, 8,2 Гц), д. 8,03 (1H, 8,2 Гц), д. 8,22 (1H, 8,0 Гц).

При описанні спектрів ЯМР H^1 використано такі скорочення: с. — синглет; уш. с. — уширений синглет; д. — дублет; д. д. — дублет дублетів; т. — триплет; к. — кватрет; м. — нерозділений мультиплет.

Використані речовини. В роботі використано препарати тотальної ДНК із сперми лосося, сумарної дріжджової РНК та БСА («Sigma», США). Для приготування всіх водних розчинів у даній роботі використовували 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,5. ДМФА переганяли під зниженим тиском.

Розчини для спектральних досліджень. Використовували стандартні розчини барвників у ДМФА концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ М та розчини ДНК і РНК у буфері концентрацій відповідно $6 \cdot 10^{-3}$ М пар основ та $1,2 \cdot 10^{-2}$ М основ.

В усіх робочих розчинах концентрація барв-

ників дорівнювала 10^{-5} М. Для отримання комплексів барвників з НК стандартні розчини барвників додавали до розчинів НК у буфері з концентраціями $6 \cdot 10^{-5}$ моль пар основ/л ДНК та $1,2 \cdot 10^{-4}$ моль основ/л РНК. В отриманих розчинах співвідношення концентрації пар основ ДНК до концентрації барвника (п. о./б.) становило 6:1, а основ РНК до барвника (о./б.) — 12:1. Робочі розчини барвників у присутності білка отримували додаванням стандартних розчинів барвників до щойно приготованого розчину БСА з концентрацією 1 мг/мл.

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра Spectord M 40 (ФРН). Спектри флуоресценції записували на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Австралія). Флуоресценцію збуджували випромінюванням з довжиною хвилі, що відповідає максимумові смуги поглинання барвника в ДМФА. Всі вимірювання здійснювали в кварцовій кюветі 1×1 см одразу після приготування розчину при кімнатній температурі. Спектри ЯМР ^1H реєстрували на приладі «Varian VXR-300», 300 МГц (США) відносно внутрішнього стандарту тетраметилсилану.

Результати і обговорення. Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у ДМФА та в буфері. Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції синтезованих барвників у ДМФА та в буфері наведено в табл. 1.

Барвники в ДМФА. Спектри поглинання всіх досліджених барвників у ДМФА у видимій області складаються з однієї смуги, максимум якої $\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДМФА}}$ розташований в інтервалі між 540 та 584 нм, а величина молярної екстинкції $\epsilon^{\text{ДМФА}}$ має значення в межах $(0,16-1,93) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Смуга барвника з хіноліновим залишком L-24 лежить в більш довгохвильовій області — $\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДМФА}}$ становить 622 нм. Крім того, спектри поглинання у ДМФА барвників L-1, L-3, L-9, L-11, L-12, L-15, L-17, L-19 та L-26 містять плече, що знаходиться на короткохвильовому схилі основної смуги на відстані 33–40 нм від її максимуму.

Спектри флуоресценції барвників у ДМФА складаються з однієї смуги з максимумом $\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДМФА}}$ в інтервалі між 573 та 620 нм. Винятком є барвники L-9 та L-24, $\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДМФА}}$ низькоінтенсивних спектрів яких лежать відповідно на 682 та 675 нм. Значення інтенсивності флуоресценції всіх синтезованих барвників $I^{\text{ДМФА}}$ знаходяться в широкому інтервалі від 0,32 до 373 відносних одиниць (в. о.).

Барвники в буфері. При зміні розчинника з ДМФА на буфер основний максимум у спектрах поглинання більшості барвників $\lambda_{\text{погл}}^{\text{буф}}$ зсувається в короткохвильову область на 2–16 нм порівняно з

$\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДМФА}}$. Довгохвильовий зсув спостерігається лише у випадку барвника L-21 (на 5 нм). При цьому в спектрах багатьох барвників з'являються додаткові максимуми переважно з короткохвильового боку основної смуги, а у випадку барвників L-14 та L-17 (рисунок) — і з довгохвильового (табл. 1). Ці додаткові максимуми, що проявляються як у вигляді плеча, так і у вигляді чітко розділених піків, напевне, відповідають асоціатам, утвореним барвниками в полярному водному середовищі. Судячи з суттєвого падіння значення молярної екстинкції $\epsilon^{\text{буф}}$ у водному буфері порівняно з $\epsilon^{\text{ДМФА}}$, барвники L-4, L-7, L-9, L-12, L-13, L-14, L-20, L-21, L-23 та L-24 взагалі малорозчинні у воді.

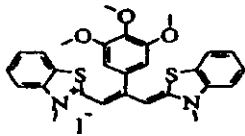
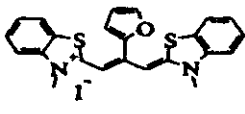
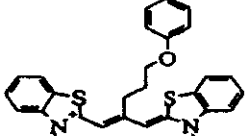
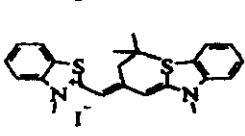
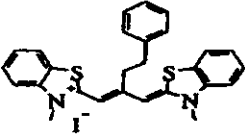
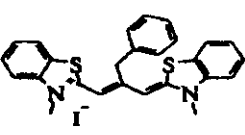
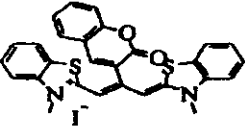
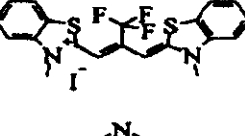
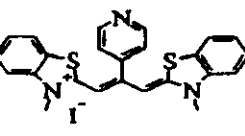
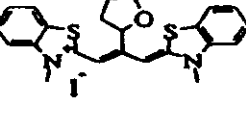
Максимуми спектрів флуоресценції розчинів барвників у буфері $\lambda_{\text{фл}}^{\text{буф}}$ зсунуті відносно $\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДМФА}}$ в короткохвильову область на відстань від 1 до 23 нм. Короткохвильовий зсув $\lambda_{\text{фл}}^{\text{буф}}$ відносно $\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДМФА}}$ мають лише L-9 (1 нм) та L-21 (120 нм), а барвник L-10 взагалі не має чіткого максимуму випромінювання в буфері. Для більшості барвників $\lambda_{\text{фл}}^{\text{буф}}$ знаходиться в інтервалі від 562 до 614 нм. Проте для барвників L-9, L-21 та L-23 $\lambda_{\text{фл}}^{\text{буф}}$ знаходиться відповідно на 683, 716 та 652 нм. Крім того, в спектрах флуоресценції L-7 та L-17 у буфері поряд з основними максимумами, що розташовані відповідно на 569 та 587 нм, з'являється додаткова смуга з максимумом відповідно на 745 та 682 нм (рисунок).

Значення інтенсивності флуоресценції барвників у буфері I_0 лежать у широкому інтервалі від 0,31 до 221 в. о. Найбільші I_0 мають барвники L-12, L-1 та L-8 (221, 104 та 80,2 в. о. відповідно). Для переважної більшості досліджених барвників I_0 менше, ніж $I^{\text{ДМФА}}$, у 1–12 разів. Подібне зменшення інтенсивності триметинціанінів у водному середовищі спостерігалось нами раніше [10]. Єдиним барвником, для якого I_0 значно (в 3,7 разу) зростає порівняно з $I^{\text{ДМФА}}$, є L-9.

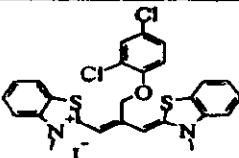
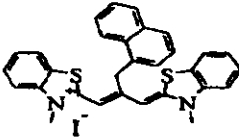
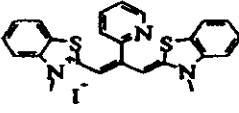
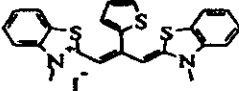
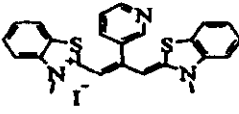
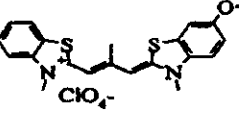
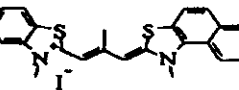
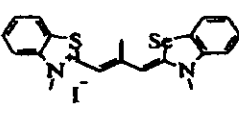
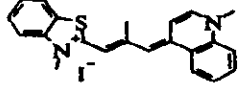
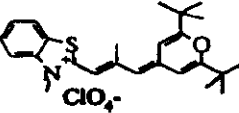
Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у присутності нуклеїнових кислот та білка. Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції барвників у присутності ДНК, РНК та БСА наведено в табл. 2.

Барвники в присутності ДНК. Основний максимум спектрів поглинання барвників у присутності ДНК $\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДНК}}$ зсувається порівняно з $\lambda_{\text{погл}}^{\text{буф}}$ у коротко- чи довгохвильову область на величину до 15 нм. Крім того, в спектрах барвників L-6 та L-8 у присутності ДНК з'являється смуга, зсунута відповідно на 34 та 41 нм у довгохвильовий бік відносно основної смуги. Такої смуги не спостерігалось в спектрах цих барвників у ДМФА та в буфері. У спектрі барвника L-17 молярна екс-

Таблиця 1
Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції барвників L-1–L-26 у ДМФА та в буфері

Барвник	Структура	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДМФА}}$, нм ($\epsilon^{\text{ДМФА}} \cdot 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДМФА}}$, нм ($\sigma^{\text{ДМФА}}$, в. о.)	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{буф}}$, нм ($\epsilon^{\text{буф}} \cdot 10^{-5}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{буф}}$, нм (σ , в. о.)
L-1		530* (0,48) 568 (1,54)	— 594 (230)	523* (0,49) 559 (1,47)	— 586 (104)
L-3		545* (0,25) 584 (0,58)	— 605 (22,9)	533* (0,22) 576 (0,45)	— 593 (17,4)
L-4		— 548 (0,53)	— 576 (86,5)	506* (0,18) 542 (0,23)	— 568 (8,25)
L-6		— 554 (0,76)	— 584 (5,7)	508* (0,25) 548 (0,51)	— ~580 (3,1)
L-7		— 549 (1,34)	— 580 (62,0)	507 (0,52) 544 (0,65)	— 569 (25,7) ~745 (1,3)
L-8		— 551 (0,89)	— 580 (115)	506 (0,38) 545 (0,57)	— 570 (80,2)
L-9		530* (0,43) 570 (1,24)	— ~682 (5,3)	— 556 (0,51)	— 683 (19,8)
L-10		584 (0,34)	~620 (0,32)	580 (0,24)	(0,31)
L-11		526* (0,41) 566 (1,05)	— ~615 (27,3)	523* (0,39) 557 (0,93)	— 614 (8,9)
L-12		524* (0,25) 561 (0,56)	— 579 (373)	510* (0,17) 552 (0,35)	— 568 (221)

Закінчення табл. 1

Барвник	Структура	$\lambda_{\text{погл ДМФА}}$, нм ($\epsilon_{\text{ДМФА}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл ДМФА}}$, нм ($\epsilon_{\text{ДМФА}}$, в. о.)	$\lambda_{\text{погл буф}}$, нм ($\epsilon_{\text{буф}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)
L-13		— 556 (0,16)	— 578 (8,0)	474 (0,0) 540* (0,07)
L-14		— 555 (0,22) —	— 577 (182) —	511* (0,08) 553 (0,15) 591* (0,07)
L-15		526* (0,58) 566 (1,77)	— 604 (21)	519* (0,55) 558 (1,61)
L-17		536* (0,33) 576 (0,97) —	— 600 (88,5) —	530* (0,36) 566 (0,59) 678 (0,03)
L-19		524* (0,42) 564 (1,28)	— 598 (65)	520* (0,44) 556 (1,16)
L-20		— — 549 (0,92)	— — 583 (24,5)	481 (0,38) 498 (0,38) 541 (0,28)
L-21		— — 558 (0,96)	— — 596 (25)	472* (0,32) 516 (0,40) 563* (0,15)
L-23		— — 545 (1,93)	— — 585 (22,4)	499 (0,66) 538 (0,66)
L-24		— 622 (0,79)	— ~675 (0,46)	566* (0,28) 610 (0,35)
L-26		534* (0,44) 567 (0,48)	— ~608 (0,8)	527* (0,36) 563 (0,45)

*Смуга проявляється у формі плеча основної смуги.

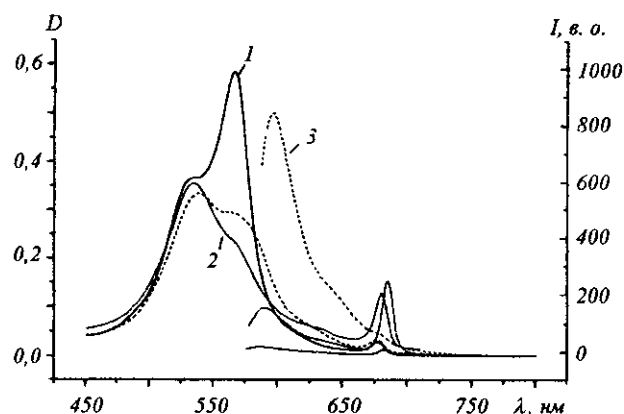
тинкція $\epsilon^{\text{ДНК}}$ довгохвильової агрегатної смуги при 680 нм збільшена з 3000 до 13000 $\text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$. Раніше ми відмічали появу подібної смуги в спектрах поглинання деяких мезо-заміщених триметинціанінів у присутності ДНК [7] та зробили висновок, що ця смуга відповідає поглинанню *J*-агрегатів барвника, утворених за участі борозенки ДНК [11]. L-6, L-8, L-14 та L-17, цілком імовірно, схильні до утворення подібних *J*-агрегатних структур за участю ДНК.

Максимуми спектрів флуоресценції барвників у присутності ДНК $\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДНК}}$ знаходяться в інтервалі між 561 та 622 нм, за винятком L-24 (665 нм). У випадку барвника L-9 поряд з короткохвильовим максимумом у вищезазначеному інтервалі в спектрі флуоресценції присутній також довгохвильовий максимум при 683 нм. У барвника L-17 інтенсивність випромінювання на довгохвильовому максимумі при 685 нм взагалі суттєво перевищує $I^{\text{ДНК}}$ на молекулярному максимумі при 590 нм (рисунк, табл. 2).

Інтенсивність флуоресценції розчинів досліджених барвників у присутності ДНК $I^{\text{ДНК}}$ зростає порівняно з I_0 до 185 разів. Високі значення зростання інтенсивності флуоресценції $\Delta Q^{\text{ДНК}} = I^{\text{ДНК}}/I_0$ та водночас високі значення інтенсивності флуоресценції $I^{\text{ДНК}}$ спостерігались для барвників L-4, L-6, L-7, L-20 та L-21. У той же час барвники L-8 та L-12, хоча й підвищують інтенсивність флуоресценції при зв'язуванні з ДНК лише в 7,78 та 2,7 рази відповідно, проте значення $I^{\text{ДНК}}$ для них є досить високим.

Барвники в присутності РНК. Максимуми спектрів поглинання барвників у присутності РНК $\lambda_{\text{погл}}^{\text{РНК}}$ для більшості барвників зсуваються в довгохвильову область порівняно з $\lambda_{\text{погл}}^{\text{буф}}$ на відстань до 15 нм, лише для L-1, L-9, L-15 та L-19 положення $\lambda_{\text{погл}}^{\text{РНК}}$ не змінюється порівняно з $\lambda_{\text{погл}}^{\text{буф}}$, а для L-17 спостерігається короткохвильовий зсув на 1 нм. Максимуми спектрів флуоресценції барвників $\lambda_{\text{фл}}^{\text{РНК}}$ знаходяться в інтервалі між 565 та 618 нм, за винятком L-24 (663 нм). У випадку барвника L-9 поряд з короткохвильовим максимумом у спектрах флуоресценції присутній також довгохвильовий максимум, розташований на 683 нм. У спектрі барвника L-17, навпаки, найінтенсивніший у присутності ДНК максимум при 685 нм практично зникає. Натомість стрімко зростає флуоресценція на молекулярному максимумі при 597 нм — 846 в. о. проти 164 в. о. в присутності ДНК (рисунк).

Інтенсивність флуоресценції барвників за присутності РНК $I^{\text{РНК}}$ зростає до 270 разів порівняно з I_0 . Барвники L-4, L-7, L-17, L-20 та L-21 мають



Спектри поглинання (зліва) та флуоресценції (справа) барвника L-17 у водному буфері в індивідуальному стані (1), у присутності ДНК (2) та РНК (3)

досить високі значення як $I^{\text{РНК}}$, так і $\Delta Q^{\text{РНК}}$ (відношення $I^{\text{РНК}}$ до I_0), а L-12 має високу інтенсивність при невеликому $\Delta Q^{\text{РНК}}$ (2,1 разу).

Барвники в присутності білка. Для більшості досліджених ціанінів молекулярний максимум поглинання в присутності білка $\lambda_{\text{погл}}^{\text{БСА}}$ не змінюється або ж зсувається на величину до 11 нм в довгохвильовий бік порівняно з $\lambda_{\text{погл}}^{\text{буф}}$. L-9 та L-10 характеризуються короткохвильовим (відповідно 7 та 1 нм) зсувом $\lambda_{\text{погл}}^{\text{БСА}}$ відносно $\lambda_{\text{погл}}^{\text{буф}}$.

Максимуми спектрів флуоресценції у присутності БСА $\lambda_{\text{фл}}^{\text{БСА}}$ для переважної більшості барвників знаходяться в інтервалі між 574 та 612 нм, за винятком L-9, L-24 ($\lambda_{\text{фл}}^{\text{БСА}}$ дорівнює відповідно 682 та 660 нм) та L-10, для якого в присутності БСА чіткого спектра флуоресценції не спостерігається. Інтенсивність випромінювання барвників у присутності білка $I^{\text{БСА}}$ зростає порівняно з I_0 до 58 разів. Слід зазначити, що для барвників L-14 та L-17 підвищення інтенсивності флуоресценції в присутності БСА $\Delta Q^{\text{БСА}}$ є досить високим (35,3 та 39,4 відповідно) і разом з тим ці ціаніни мають високе значення $I^{\text{БСА}}$. Зважаючи на те, що аналогічний метил-заміщений барвник Суап 2 не є чутливим до білка, можна зробити висновок, що введення до β -положення залишків 1-нафталеноцту та 2-тіофену суттєво сприяє підвищенню чутливості отриманих барвників до БСА.

Барвники, як зонди для нуклеїнових кислот. Найважливішою характеристикою спектрів розглянутих барвників у світлі їхнього можливого застосування для флуоресцентної детекції НК слід назвати підвищення інтенсивності випромінювання при зв'язуванні з НК — $\Delta Q^{\text{НК}}$. За цією величиною

Таблиця 2
Характеристики спектрів поглинання та флуоресценції досліджуваних барвників у присутності нуклеїнових кислот та білка

Барвник	$\lambda_{\text{погл ДНК}}, \text{нм}$ ($\epsilon_{\text{ДНК}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл ДНК}}, \text{нм}$ ($f_{\text{ДНК}}, \%$)	$\Delta Q_{\text{ДНК}}$	$\lambda_{\text{погл РНК}}, \text{нм}$ ($\epsilon_{\text{РНК}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл РНК}}, \text{нм}$ ($f_{\text{РНК}}, \%$)	$\Delta Q_{\text{РНК}}$	$\lambda_{\text{погл БСА}}, \text{нм}$ ($\epsilon_{\text{БСА}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл БСА}}, \text{нм}$ ($f_{\text{БСА}}, \%$)	$\Delta Q_{\text{БСА}}$
L-1	522* (0,42)	—	—	522* (0,42)	—	—	523* (0,51)	—	—
	559 (1,29)	586 (212)	2,1	559 (1,25)	587 (440)	4,2	560 (1,54)	585 (420)	4,1
L-3	536* (0,17)	—	—	543* (0,24)	—	—	538* (0,25)	—	—
	579 (0,36)	603 (234)	13	580 (0,34)	605 (488)	28	577 (0,47)	604 (402)	23
L-4	510* (0,13)	—	—	513* (0,16)	—	—	513 (0,24)	—	—
	544 (0,24)	565 (1090)	132	547 (0,18)	574 (635)	77	550 (0,23)	577 (476)	58
L-6	—	—	—	517* (0,28)	—	—	515* (0,28)	—	—
	550 (0,37)	—	—	550 (0,40)	584 (161)	52	550 (0,52)	596 (139)	45
	584* (0,25)	603 (449)	145	—	—	—	—	—	—
L-7	510* (0,36)	—	—	513 (0,48)	—	—	513 (0,62)	—	—
	543 (0,68)	573 (1560)	61	546 (0,50)	581 (745)	29	550 (0,61)	580 (283)	11
L-8	510* (0,28)	—	—	512 (0,32)	—	—	—	—	—
	545 (0,39)	570 (624)	7,8	546 (0,36)	575 (463)	5,8	551 (0,58)	580 (475)	5,9
	586* (0,12)	—	—	—	—	—	—	—	—
L-9	554 (0,38)	576 (3,1)	10	556 (0,44)	~586 (2,5)	9,6	549 (0,60)	—	—
	—	683 (29,1)	1,5	—	683 (6,7)	0,3	—	682 (104)	5,3
L-10	—	—	—	547* (0,19)	—	—	—	—	—
	584 (0,26)	605 (14,8)	49	586 (0,31)	611 (28,2)	91	579 (0,25)	— (0,7)	2,3
L-11	519* (0,29)	—	—	520* (0,30)	—	—	519* (0,33)	—	—
	558 (0,69)	~615 (35)	3,9	559 (0,68)	613 (156)	18	557 (0,71)	596 (39,4)	4,4
L-12	515* (0,12)	—	—	516* (0,14)	—	—	515* (0,22)	—	—
	556 (0,21)	576 (554)	2,7	556 (0,18)	584 (254)	1,2	552 (0,39)	575 (276)	1,3
L-13	475 (0,09)	—	—	477 (0,08)	—	—	480 (0,09)	—	—
	548 (0,08)	563 (393)	62	548 (0,08)	567 (566)	90	548 (0,08)	578 (40,2)	6,4
L-14	530* (0,09)	—	—	514* (0,08)	—	—	—	—	—
	568 (0,11)	583 (430)	10	558 (0,12)	578 (590)	14	564 (0,17)	578 (1460)	35
L-15	519* (0,50)	—	—	520* (0,55)	—	—	520* (0,60)	—	—
	559 (1,44)	593 (52)	2,4	558 (1,38)	600 (102)	4,7	558 (1,71)	594 (72)	3,4
L-17	535 (0,36)	—	—	538 (0,33)	—	—	537* (0,34)	—	—
	568* (0,23)	590 (164)	5,1	578* (0,27)	597 (846)	27	571 (0,58)	599 (1260)	39
	680 (0,13)	685 (260)	11	677 (0,04)	—	—	677 (0,02)	—	—
L-19	519* (0,32)	—	—	523* (0,38)	—	—	519* (0,43)	—	—
	556 (0,87)	594 (114)	4,1	556 (0,80)	598 (355)	13	556 (1,19)	590 (190)	6,8
L-20	470* (0,10)	—	—	488* (0,28)	—	—	471 (0,38)	—	—
	514* (0,28)	—	—	508 (0,31)	—	—	501* (0,31)	—	—

Закінчення табл. 2

Барвник	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{ДНК}}$, нм ($\epsilon^{\text{ДНК}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{ДНК}}$, нм ($f^{\text{ДНК}}$, в о.)	$\Delta Q^{\text{ДНК}}$	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{РНК}}$, нм ($\epsilon^{\text{РНК}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{РНК}}$, нм ($f^{\text{РНК}}$, в о.)	$\Delta Q^{\text{РНК}}$	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{БСА}}$, нм ($\epsilon^{\text{БСА}} \cdot 10^{-5}$, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$)	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{БСА}}$, нм ($f^{\text{БСА}}$, в о.)	$\Delta Q^{\text{БСА}}$
L-23	471* (0,17)	—	—	479* (0,46)	—	—	470* (0,57)	—	—
	509* (0,49)	—	—	502 (0,54)	—	—	496 (0,62)	—	—
	541 (0,71)	575 (293)	27	542 (0,47)	580 (464)	43	540 (0,56)	579 (48,2)	4,4
L-24	—	—	—	542* (0,24)	—	—	—	—	—
	579* (0,31)	—	—	576 (0,27)	—	—	568* (0,33)	—	—
	622 (0,38)	~665 (4,5)	11,5	625 (0,27)	~663 (11)	28	611 (0,39)	~660 (4,9)	12
L-26	534* (0,32)	—	—	532* (0,36)	—	—	530* (0,41)	—	—
	567 (0,40)	615 (9,6)	21	564 (0,42)	610 (30,3)	66	563 (0,48)	~612 (4,1)	8,9

*Смуга проявляється у формі плеча основної смуги.

потрібно виокремити барвники L-4, L-6, L-7, L-10, L-13 та L-20—L-23. В їхній хімічній будові (табл. 1) легко помітити одну спільну рису. Радикал у мезо-положенні має найменші серед представлених барвників геометричні розміри. Це — метильна група у барвників L-20—L-23 або об'ємніші фенільний у барвників L-4, L-7 і L-13 та третбутильний у L-6 залишки, зв'язані з мезо-положенням аліфатичним ланцюжком з 1(L-6)—4(L-4) CH_2 -груп та атомів кисню. Для барвника L-10 із заміником більших розмірів — CF_3 -групою у мезо-положенні — хоча й спостерігається високе значення $\Delta Q^{\text{НК}}$, загальна інтенсивність випромінювання $I^{\text{НК}}$ порівняно невисока (табл. 2), вона не набагато перевищує фонове випромінювання I_0 барвників L-4, L-7, L-20—L-23. Вторинний аліфатичний радикал (L-12), арильні (L-1, L-2, L-9, L-11, L-15, L-17 і L-19) та бензильні (L-8 та L-14) радикали виявилися для триметинціаніну мезо-замісниками занадто великих розмірів, так що для цих барвників взаємодія з НК, хоча й відбувається, проте не призводить до достатнього підвищення інтенсивності флуоресценції. Навпаки, коли досить об'ємні замісники зв'язані з мезо-положенням гнучким ланцюжком з двох і більше CH_2 -груп — такі барвники за величиною $\Delta Q^{\text{НК}}$ майже не відрізняються від мезо-метил-заміснених барвників, для яких ця величина найбільша. Така властивість може бути використана вже для отримання на основі триметинціанінів ковалентних флуоресцентних міток.

S. S. Lukashov, M. Yu. Losytskyy, Yu. P. Kovtun, S. M. Yarmoluk
Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. Meso-substituted trimethincyanines for fluorescent detection of nucleic acids

Summary

A series of trimethincyanines with different meso-substituents in polymethine chain has been synthesized, and spectral luminescent properties of the dyes in the presence of double-stranded DNA, RNA and bovine serum albumin (BSA) have been examined. The dyes fluorescence enhances up to 270-fold in the presence of nucleic acids while in the presence of protein the increase is lower. The highest rise of fluorescence intensity has been observed for the dye-nucleic acid complexes of meso-methyl-substituted dyes. When large substituents like aryl- or tert-alkyl groups are linked to the meso-position of the dyes polymethine chain by a flexible chain from 1–3 CH_2 -groups, the fluorescent properties of these dyes are similar to those of the meso-methyl-substituted dyes.

С. С. Лукашов, М. Ю. Лосицкий, Ю. П. Ковтун, С. Н. Ярмолюк

Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. Мезо-замещенные триметинцианиновые красители для флуоресцентной детекции нуклеиновых кислот

Резюме

Синтезирован ряд новых симметричных и несимметричных триметиновых цианинов с разнообразными заместителями в мезо-положении полиметиновой цепи. В присутствии ДНК, РНК и в меньшей мере в присутствии белка интенсивность флуоресценции красителей повышается. Увеличение интенсивности достигает 270 раз. Наибольшие значения возрастания интенсивности наблюдаются для красителей с метильной группой в мезо-положении полиметиновой цепи. Если более массивная группа — ароматические или трет-алкильный остаток соединены с мезо-положением гибкой алифатической цепочкой из 1–3 CH_2 групп — то флуоресцентные свойства таких красителей в присутствии нуклеиновых кислот близки свойствам мезо-метил-замещенных красителей.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Haugland R. P.* Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes Inc.—Eugene: OR, 1996.—680 p.
2. *Zhu H., Clark S. M., Benson S. K., Rye H. S., Glazer A. N.* High-sensitivity capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using monomeric and dimeric fluorescent intercalating dyes // *Anal. Chem.*—1994.—66, N 13.—P. 1941—1948.
3. *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.
4. *Livache T., Fouque B., Teoule R.* Detection of HIV 1 DNA in biological samples by an homogeneous assay: fluorescence measurement of double-stranded RNA synthesized from amplified DNA // *Anal. Biochem.*—1994.—217.—P. 248—254.
5. *Schneeberger C., Speiser P., Kury F., Zeillinger R.* Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain // *PCR Meth. and Appl.*—1995.—4.—P. 234—238.
6. *Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Lukashov S. S., Slominskii Y. L.* Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XII. β -substituted carbocyanines as possible fluorescent probes for nucleic acid detection // *Biol. and Med. Chem. Lett.*—1999.—9, N 12.—P. 1677—1678.
7. *Лукашов С. С., Лосицький М. Ю., Сломінський Ю. Л., Ярмолюк С. М.* Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 7. Карбоціанінові барвники, заміщені в поліметиновому ланцюзі, як можливі зонди для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот // *Біополімери і клітина.*—2001.—17, № 2.—С. 169—177.
8. *Лукашов С. С., Маковенко І. Є., Лосицький М. Ю., Сломінський Ю. Л., Ярмолюк С. М.* Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 33. Мезо-метил-заміщені триметинціанінові барвники як можливі зонди для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот // *Біополімери і клітина.*—2001.—17, № 5.—С. 448—454.
9. *Hamer F. M.* The chemistry of heterocyclic compounds. 18, The cyanine dyes and related compounds.—New York; London: J. Willey, 1964.—790 p.
10. *Ярмолюк С. М., Лосицький М. Ю., Ковальська В. Б., Огульчанський Т. Ю., Лукашов С. С., Костенко О. М., Курдюков В. В., Толмачев О. І.* Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. Новий (піридо)(-тіо)триметинціаніновий барвник ССуап 40 для флуоресцентного мічення олігонуклеотидів // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № .—С. в друці.
11. *Ogul'chansky T. Yu., Losytskyu M. Yu., Kovalska V. B., Lukashov S. S., Yashchuk V. M., Yarmoluk S. M.* Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XVIII. Formation of the carbocyanine dye J-aggregates in nucleic acid grooves // *Spectrochim. acta. Part A.*—2001.—57.—P. 2705—2715.

УДК УДК 535.372

Надійшла до редакції 05.06.01