

Нові стирилціаніни та їх димери як флуоресцентні барвники для детекції нуклеїнових кислот: синтез і спектрально-люмінесцентні властивості

А.О. Баланда, К.Д. Волкова, В.Б. Ковальська,
М.Ю. Лосицький, С.С. Лукашов, С.М. Ярмолюк*

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

Резюме. Для розробки ДНК-чутливих флуоресцентних зондів було синтезовано серію нових (*n*-диметиламіностирил)бензотіазолових барвників із тетраалкіламонійними групами. Досліджено спектрально-люмінесцентні властивості одержаних барвників як у вільному стані, так і в присутності нуклеїнових кислот (НК) та БСА (бичачий сироватковий альбумін). Показано, що димерні стирилціанінові барвники з двома тетраалкіламонійними групами у складі лінкеру більш ніж на три порядки підвищують інтенсивність флуоресценції у присутності ДНК. Досліджено механізм взаємодії синтезованих стирилціанінів із длДНК і запропоновано можливий механізм їх зв'язування. Вивчено можливість використання стирилціанінів як зондів для флуоресцентної візуалізації нуклеїнових кислот у живих клітинах.

Ключові слова: стирилціанінові барвники, детекція нуклеїнових кислот.

Вступ. Стирилціаніни завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям успішно застосовуються у різноманітних біологічних дослідженнях [1-3]. Стирилціанінові барвники відомі як найбільш чутливі зонди для неспецифічної флуоресцентної детекції білків у додецил-сульфат-поліакриламідному гелі [1]. Вони також були запропоновані нами як ДНК-специфічні флуоресцентні зонди [5, 6]. Стирилціаніни мають великі значення перерізу двофотонного поглинання [7-11] і можуть використовуватися як двофотонно збуджувані флуоресцентні зонди для детекції біооб'єктів. Слід також сказати, що ці барвники завдяки своїй здатності проникати через клітинну мембрану запропоновані для викори-

стання у мікрофлуоресцентній цитології для візуалізації клітин та окремих органел, наприклад, для візуалізації клітинних компонентів крові [3, 10, 13].

Нещодавно нами було синтезовано серію димерних *p*-диметиламіностирилціанінів на основі піридинового, бензотіазолового, бензоксазолового та 1,3,3-триметил-3*H*-індолового гетероциклів. Показано, що синтезовані барвники можуть застосовуватися як флуоресцентні зонди для детекції ДНК у розчині [5, 6].

Продовжуючи ці дослідження, ми синтезували серію нових мономерних і димерних стирилціанінів та вивчили їх спектрально-люмінесцентні властивості у присутності нуклеїнових кислот і БСА. Для підвищення ДНК-чутливості флуоресцентних зондів ми ввели в барвник тетраалкіламонійні ефекторні групи, що сприяють зв'язуванню барвника з ДНК [14]. Було досліджено механізм зв'язування стирилціанінів із длДНК. Для ряду барвників

*Corresponding author.

Tel./fax: +38044-5222458

E-mail address: sergiy@yarmoluk.org.ua

© А.О. Баланда, К.Д. Волкова, В.Б. Ковальська,
М.Ю. Лосицький, С.С. Лукашов, С.М. Ярмолюк, 2006

вивчено здатність проникати в клітини та візуалізувати нуклеїнові кислоти з використанням методу флуоресцентної мікроскопії.

Матеріали і методи. Електронні спектри поглинання записували на приладі Specord M-40 (Carl Zeiss, Німеччина). Для реєстрації спектрів флуоресценції використовували флуоресцентний спектрофотометр Cary Eclipse (Varian, Австралія). Усі виміри проводили в кварцевій кюветі (10x10 мм) при кімнатній температурі. ¹H-ЯМР-спектри були записані в ДМСО-d₆ на приладі Varian (300 MHz) із використанням ТМС як внутрішнього стандарту.

Приготування стокових розчинів. Стокові розчини барвників (2x10⁻³ М) готували, розчиняючи наважки барвників у ДМФА. Тотальна ДНК із лосося, сумарна дріжджова РНК і БСА були одержані з Sigma (США). Стокові розчини нуклеїнових кислот і БСА готували, розчиняючи наважку біополімеру в 0,05 М Tris-HCl буфері (рН 8.0). Концентрація нуклеїнових кислот і БСА в розчині становила 6x10⁻³ М пар основ (п.о.) для ДНК, 1,2x10⁻² М о. для РНК та 0,2 мг/мл для БСА.

Приготування робочих розчинів. Робочі розчини барвників готували, розводячи стокові розчини барвників у буфері чи метанолі. Робочі розчини комплексів барвник-ДНК (-РНК) готувалися додаванням аліквот стокових розчинів барвників і нуклеїнових кислот до буфера, робочі розчини барвника в присутності БСА — шляхом змішування стокових розчинів барвника і білка. Концентрації барвника, ДНК, РНК і БСА в робочих розчинах становили відповідно 5x10⁻⁶ М, 6x10⁻⁵ М п.о., 1,2x10⁻⁴ М о. та 0,2 мг/мл.

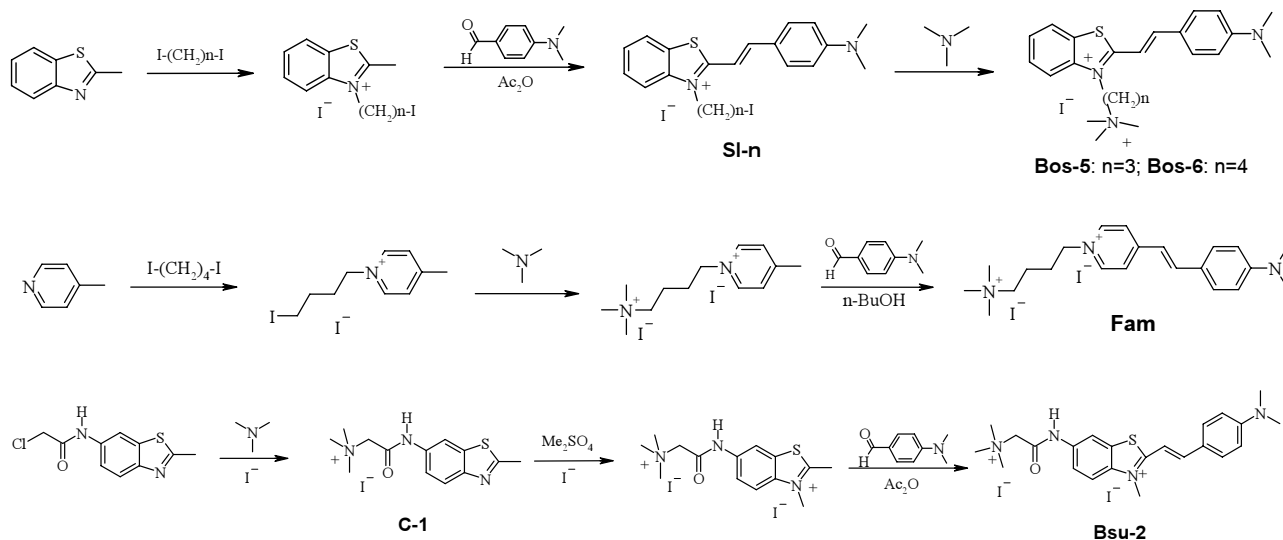
Культивування культури клітин гіпокампу низької щільності. Виділений гіпокамп новонародженого щура поміщали у фосфатно-буферний сольовий розчин Дюльбекко (Sigma D5652). Потім гіпокамп розрізали на кілька частин та занурювали у 25 %-вий розчин ферменту трипсину (Sigma T4799) при температурі 37 °С на 10 хвилин, після чого шматки тканини промивали холодним (4-8 °С) культуральним середовищем для інактивації ферменту. Склад культурального середовища: MEM (modified Eagle medium) із глутамакс-1 із 25 мМ HEPES (Gibco 42360-024), 10 %-ва сироватка коняча (Gibco 26050-088), 1 %-ва N-2

добавка (Gibco 17502), гентаміцин (Gibco 15710-049). Тканина диспергувалася (за допомогою трьох пастерівських піпеток із діаметрами, що поступово зменшуються) до однорідної суспензії. Суспензію клітин рівномірно розподіляли на сухі покрівні скельця, що заздалегідь були вкриті сумішшю 0,05 мг/мл полі-L-лізину (Sigma) з 0,005 мг/мл ламініну (Sigma L2020), з розрахунку 5-42x10³ клітин/см². Культура розвивалася в інкубаторі при температурі 37 °С в атмосфері з 5 % CO₂. На третій день культивування у кожную чашку додавали 5x10⁻⁶ М цитозин-β-d-арабіно-фуранозиду (Sigma C6645)(ARA-C) для інгібування проліферації гліальних клітин. Через 16 годин повністю заміняли середовище культивування на середовище, що не містить цитостатик. Кожні 5-7 днів проводили заміну 0,25 мл культурального середовища на свіже. Усі культури використовували для експерименту після тринадцяти днів інкубації. Стокові розчини барвників додавали безпосередньо в культуру клітин для одержання необхідних концентрацій барвників (40 μМ). Клітини візуалізували при кімнатній температурі.

Результати й обговорення. Синтез стирилціанінів. Загальні схеми синтезу стирилціанінів та хімічні структури барвників наведено на схемі 1 та рис. 1. Нами було запропоновано два способи синтезу стирилціанінів із позитивно зарядженими ефекторними групами. За першим способом для одержання барвників **Bos-4—Bos-6** і **Bos-12** на першій стадії синтезу одержували четвертинну сіль шляхом нагрівання 2-метил-1,3-бензотіазолу з надлишком дийодалкану в діоксані (мет. 1). Далі реакцією конденсації цієї солі з *n*-диметиламінобензальдегідом були синтезовані барвники з йодалкільними ніжками — **SI-3**, **SI-4** і **SI-5** (мет. 2), взаємодією яких з розчином триметилаїну було синтезовано стирилціаніни **Bos-5** та **Bos-6** відповідно (мет. 3). Барвники **Bos-12** та **Bos-4** було одержано при нагріванні **SI-4** з надлишком N,N,N',N'-тетраметил-1,4-фенілендіаміну (мет. 4) та піридину (мет. 5) відповідно.

За другим способом спочатку синтезували четвертинну сіль азогетероциклу з позитивно зарядженою ефекторною групою, а потім проводили реакцію конденсації. На першій стадії синтезу барвника **Fam** алкілуванням 4-ме-

Синтез і структури барвників



тилпіридину надлишком 1,4-дйодбутану одержували четвертинну сіль з йодалкільною ніжкою (мет. 6), взаємодією якої з розчином триметиламіну в діоксані синтезували піридинієву сіль з триметиламонійною ефекторною групою (мет. 7). Реакцію конденсації з *n*-диметиламінобензальдегідом проводили в *n*-бутанолі в присутності піперидину (мет. 8).

За аналогічною схемою були одержані барвники **Bos-2** і **Bos-3** шляхом сплавлення вихідних азогетероциклів із гідрохлоридом 3-(диметиламіно)пропілхлориду і бромідом 3-бромопропіл(триетил)амонію відповідно (мет. 9). Конденсацію утворених солей з *n*-диметиламіно-

бензальдегідом проводили за мет. 2. Синтезовані стирилціаніни переводили в йодиди шляхом додавання до насиченого розчину барвників у метанолі водного розчину KI.

Було синтезовано стирилціаніни із замісниками в 6 положенні бензотіазолового ядра. За мет. 10 одержано ацетильне та хлорацетильне похідні 6-аміно-2-метилбензотіазолу. Взаємодією останнього з триметиламіном синтезовано сполуку **C-1** із триметиламонійним фрагментом у складі замісника (мет. 7) (схема 1). Щоб одержати барвник **Bsu-3**, 6-аміно-2-метилбензотіазол проацильовали янтарним ангідридом і циклізували утворену кислоту до 1-

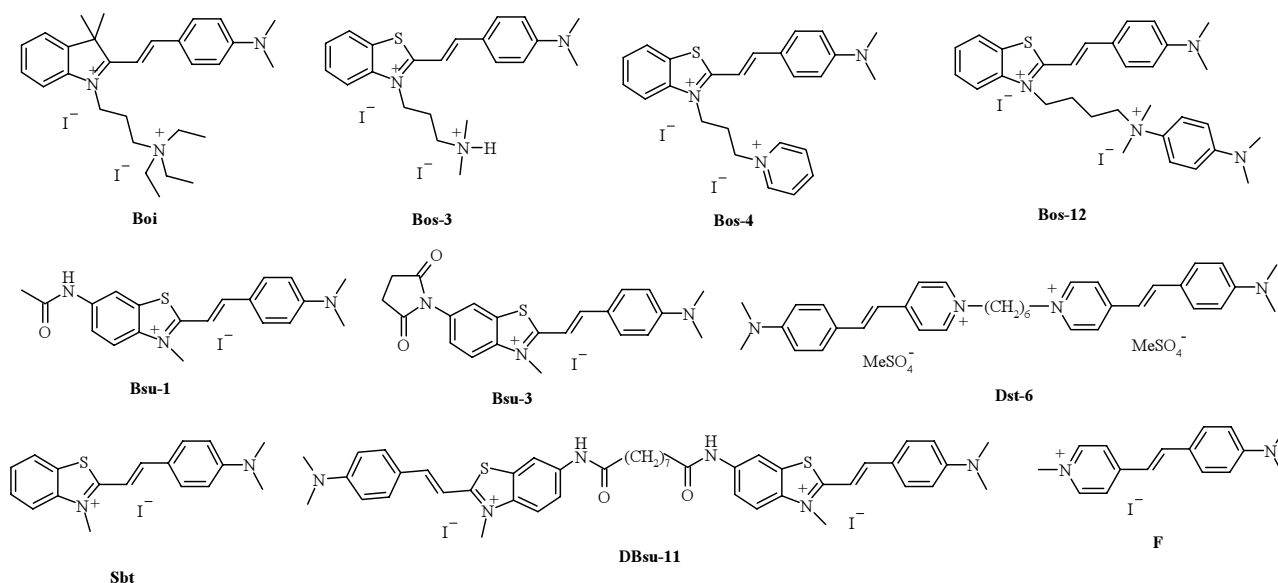
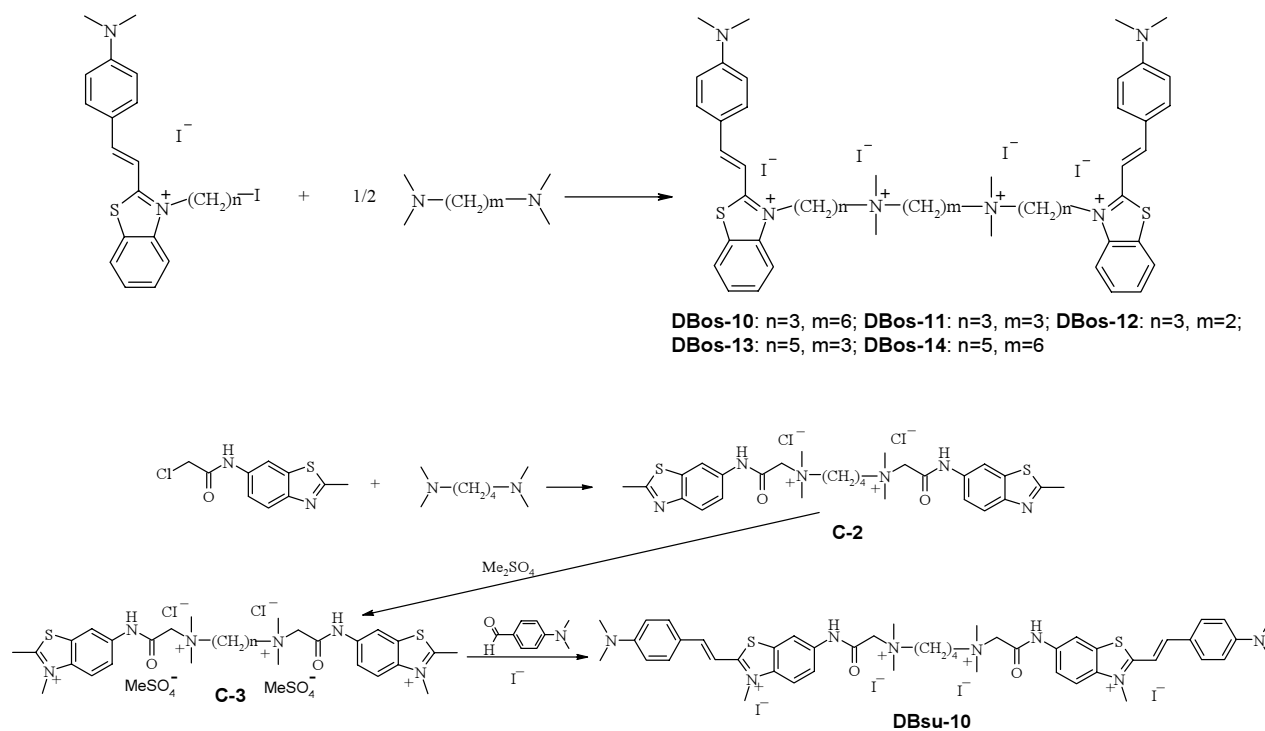


Рис. 1. Структури синтезованих барвників.

Синтез і структури димерних барвників



(2-метил-1,3-бензотіазол-6-іл)-2,5-піролідіону (мет. 11). Нами було використано N,N'-карбонілдімідазол (КДІ) як реагент у реакції циклізації. Далі всі одержані 6-заміщені-2-метилбензотіазоли алкілували диметилсульфатом за мет. 12, конденсацію синтезованих четвертинних солей проводили в оцтовому ангідриді (мет. 2). Барвники **Bsu-1** та **Bsu-2** переводили в йодиди, додаючи концентрований розчин KI.

Алкілуванням **SI-3** та **SI-5** відповідних N,N,N',N'-тетраметилдіаміноалканів (мет. 13) було одержано димерні стирилціаніни з двома алкіламонійними групами в складі лінкеру (**DBos-10—DBos-14**) (схема 2).

Щоб одержати димери з лінкером у 6 положенні бензотіазольного ядра, ми використали 6-аміно-2-метилбензотіазол. Взаємодією хлорацетильного похідного 6-аміно-2-метилбензотіазолу з N,N,N',N'-тетраметилдіамінобутаном було синтезовано сполуку **C-2**, алкілування якої диметилсульфатом дало змогу одержати димерну четвертинну сіль **C-3** (мет. 14). Конденсацією **C-3** з альдегідом в оцтовому ангідриді був синтезований димерний барвник **DBsu-10** (мет. 15) (схема 2). Щоб одержати димерний барвник **DBsu-11**, дихлорангідридом

дикарбонової кислоти проацильовали 6-аміно-2-метилбензотіазол. Подальше алкілування диметилсульфатом утвореного продукту дало змогу синтезувати біс-четвертинну сіль (мет. 16), конденсацією якої з двома еквівалентами *n*-диметиламінобензальдегіду був синтезований димерний стирилціанін. Барвник **Dst-6** одержано згідно з [5].

Спектральні властивості барвників. Спектральні характеристики стирилціанінів у метанолі та водному розчині подано в табл. 1. Досліджувані бензотіазольні барвники мають широкі смуги поглинання, що є типовим для стирилціанінів. Максимуми цих смуг у метанолі знаходяться між 520 і 535 нм (за винятком **DBos-13**, максимум поглинання якого розташований на 499 нм із плечем на 525 нм). Для димерів **DBos-10** і **DBos-14** у спектрі поглинання спостерігається короткохвильове плече на 504 нм. Коефіцієнти молярної екстинкції барвників у метанолі набувають значень від $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ до $8,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

У водному розчині більшість мономерних стирилціанінів мають гіпсохромний зсув максимуму поглинання до 14 нм (для **Vo1** спостерігається батохромний зсув на 3 нм). Гіпсохромний зсув для димерів **DBos**-серії дорів-

Спектрально-люмінесцентні характеристики барвників у вільному стані

Барвник	У метанолі				У буфері			
	$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{збф}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	$I_0, \text{у.о.}$	$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{збф}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	$I_0, \text{у.о.}$
Boi	556	557	596	26,2	559	560	594	22,6
Bos-3	526	533	594	40,5	523	536	597	17,3
Bos-4	535	543	598	34,8	532	544	600	16,6
Bos-5	535	541	595	32	530	540	596	21,4
Bos-6	531	540	595	52	521	536	596	23,8
Bos-12	532	540	598	48	526	542	597	23
DBos-10	533 504*	540	597	35,2	493	543	598	2,7
DBos-11	534	542	599	39,4	502	540	598	3,9
DBos-12	533	546	601	55	508	550	601	5,2
DBos-13	499 525*	538	597	39,6	490	535	596	1,2
DBos-14	525 504*	539	595	35,4	490	536	595	3,5
Fam	486	494	615	21,4	461	474	615	6,7
Bsu-1	525	537	599	87	511	532	597	36
Bsu-2	532	540	601	67,7	519	535	599	28,6
Bsu-3	533	540	598	49,9	531	540	598	23,9
DBsu-10	520	541	601	56,5	470	561	616	10
DBsu-11	520	536	601	56,7	468	544	602	1,5

Примітки: $\lambda_{\text{погл}}$, $\lambda_{\text{збф}}$, $\lambda_{\text{фл}}$ — довжина хвилі максимуму поглинання, збудження флуоресценції та випромінювання при збудженні на довжині хвилі максимуму збудження флуоресценції; I_0 — інтенсивність власної флуоресценції барвника; * — виявляється у вигляді плеча.

нює 25–40 нм (для **DBos-13** — 9 нм), а для димерів **DBsu-10** і **DBsu-11** — 50 та 52 нм відповідно (рис. 2). Разом зі зміною положення максимуму спостерігалася зміна форми смуги поглинання димерних стирилціанінів, що свідчить про наявність Н-агрегатів у розчинах барвників. Для дослідження стійкості агрегатів, що утворюються, ми провели серію додаткових експериментів. Спектр поглинання барвника **DBsu-10** у буфері був записаний при температурі 65 °С. На рис. 2 видно, що при високій температурі максимум поглинання зміщується на 510 нм, а на 470 нм спостерігається плече, що відповідає поглинанню агрегатів. Форма смуг поглинання **DBsu-10** і **DBos-13** у буфері майже не змінюється навіть при досить низьких концентраціях барвників (2×10^{-7} М), що свідчить про високу здатність димерів до агрегатоутворення, очевидно, за рахунок формування внутрішньомолекуляр-

них агрегатів. Для барвників **DBos**-серії при довжині лінкера 14 атомів та більше спостерігається плече на довжині хвилі поглинан-

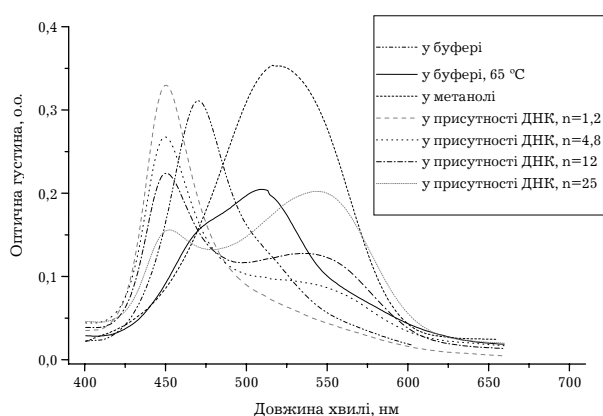


Рис. 2. Спектри поглинання барвника **DBsu-10** у вільному стані та в присутності ДНК (n — відношення кількості пар основ ДНК до кількості хромофорів барвника, о.о. — оптичні одиниці).

ня агрегатів навіть у метанолі, а для барвника **DBos-13** смуга поглинання агрегатів проявляється як основний пік.

Положення максимумів збудження флуоресценції барвників порівняно з відповідними максимумами поглинання зміщені у довгохвильову область: для мономерних барвників — до 21 нм, а для димерних — до 39 нм у метанолі та до 91 нм у буфері.

Для більшості досліджених стирилціанінів максимумами спектрів флуоресценції в метанолі та в буфері знаходяться в інтервалі 594–602 нм (окрім **Fam** і **DBsu-10**). Усім барвникам притаманна низька інтенсивність флуоресценції — у діапазоні 21,4–87 у.о. (умовних одиниць) у метанолі та 1,2–36 у.о. в буфері. Слід зазначити, що для димерних барвників інтенсивність флуоресценції в буфері (1,2–10 у.о.) за рахунок агрегаційних процесів значно менша, ніж для відповідних мономерів.

Спектральні властивості барвників у присутності нуклеїнових кислот. Характеристики спектрів поглинання, збудження флуоресценції та випромінювання досліджуваних барвників у присутності нуклеїнових кислот подано в табл. 2. Максимуми поглинання мономерних стирилціанінів **Bos**-серії в присутності НК зсунуті в довгохвильову область на 19–28 нм і знаходяться в межах 535–557 нм. Для **DBos**-димерів у присутності НК зсув максимумів поглинання значно більший — до 64 нм. Очевидно, що в присутності ДНК агрегати димерних барвників руйнуються і ми спостерігаємо максимум на довжині хвилі поглинання мономера. У присутності РНК агрегати барвників **DBos-10** і **DBos-14** руйнуються не повністю і проявляються на кривій поглинання у вигляді плеча.

Максимуми поглинання барвників **Bsu-1**—**Bsu-3** порівняно з відповідними максимумами поглинання у буфері також зсунуті у довгохвильову область. Для димера **DBsu-10** спостерігається два максимуми поглинання в присутності ДНК: один має зсув у короткохвильову область на 20 нм у порівнянні з максимумом поглинання в буфері, а другий на 68 нм зсунутий у довгохвильову область (рис. 2). Для барвника **DBsu-11** у присутності ДНК спостерігається лише один максимум, зсунутий на 17 нм у короткохвильову область. На рис. 2 на-

ведені спектри поглинання при різних співвідношеннях барвника **DBsu-10** до пар основ ДНК. Якщо співвідношення пар основ ДНК до кількості хромофорів барвника становить 1,2:1, спостерігається лише короткохвильова смуга поглинання (на 450 нм) у порівнянні зі спектром поглинання вільного барвника. Ця смуга пояснюється утворенням агрегатів із молекул барвника на ДНК. При збільшенні співвідношення пар основ ДНК до кількості хромофорів барвника з'являється довгохвильова молекулярна смуга поглинання барвника. При співвідношенні пар основ ДНК до кількості хромофорів барвника 25:1 інтенсивність молекулярної смуги поглинання переважає інтенсивність агрегатної смуги поглинання.

Для комплексів (*n*-диметиламіностирил)бензотіазольних барвників із НК максимуми збудження флуоресценції (548–567 нм для комплексів із ДНК і 564–579 нм для комплексів із РНК) зсунуті в довгохвильову область порівняно з відповідними максимумами поглинання. Досить великий зсув (на 97 нм) спостерігається для барвника **DBsu-11**.

Максимуми спектрів емісії досліджуваних стирилціанінів у присутності ДНК знаходяться в діапазоні 593–610 нм, а в присутності РНК незначно зсунуті в довгохвильову область (609–615 нм). Взаємодіючи з нуклеїновими кислотами, усі барвники цієї серії, окрім **Bsu-2** і **Bsu-3**, демонструють ДНК-специфічність.

Щоб оцінити вплив ефекторних груп у складі стирилціанінів на ефективність утворення флуоресцентних комплексів барвник-ДНК, спектрально-люмінесцентні характеристики синтезованих стирилціанінів порівнювали з описаним (*n*-диметиламіностирил)бензотіазольним барвником **Sbt** [4, 12]. Було показано, що інтенсивність флуоресценції комплексів барвник-ДНК для бензотіазольних стирилів **Bos**-серії значно вища, ніж для барвника **Sbt** (до 2100 у.о. в порівнянні з 448 у.о. для **Sbt**). Підвищення інтенсивності флуоресценції (I/I_0) для стирилціанінів **Bos-3**—**Bos-6** у присутності ДНК становить 69–103 рази (для **Bos-12** — 43 рази), що значно перевищує цей показник для барвника **Sbt** (22 рази). Отже, тетраалкіламонійна група, що зв'язана короткою аліфатичною ніжкою з молекулою стирилціаніну, сприяє зв'язуванню барвника з ДНК. Для

Спектрально-люмінесцентні характеристики барвників у присутності біополімерів

Барвник	У присутності ДНК					У присутності РНК					У присутності БСА				
	$\lambda_{\text{полл}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{збф}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	I, у.о.	I/I_0	$\lambda_{\text{полл}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{збф}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	I, у.о.	I/I_0	$\lambda_{\text{полл}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{збф}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	I, у.о.	I/I_0
Boi	563	577	602	417	18,5	560	580	606	145	6,4	559	563	597	27,3	1,2
Bos-3	551	555	598	1773	103	554	575	611	1332	77	524	541	596	20	1,2
Bos-4	554	564	607	1150	69	551	576	613	1091	66	532	546	598	26,7	1,6
Bos-5	554	566	607	2100	98	543	576	611	1636	76	530	542	597	29,1	1,4
Bos-6	548	560	605	1864	78	543	572	610	1314	55	520	540	594	33	1,4
Bos-12	545	562	606	985	43	535	572	609	689	30	526	545	597	34	1,5
DBos-10	557	567	608	1205	446	553 529*	575	613	496	184	493	548	599	22,9	8,5
DBos-11	554	563	610	1469	377	546	573	614	445	114	501	547	598	23	5,9
DBos-12	538	565	607	342	66	538	576	615	335	64	507	547	599	10,5	2
DBos-13	554	561	605	1695	1413	508 556*	564	609	307	256	491	546	596	11,6	9,7
DBos-14	556	562	606	1918	548	551 518*	566	609	623	178	491	545	596	13,4	3,8
Fam	486	506	607	486	73	483 450*	524	616	407	61	458	479	602	12	1,8
Bsu-1	518	555	604	379	10,5	512	575	612	291	8	511	537	597	47	1,3
Bsu-2	562 540*	557	605	1009	35	562 540*	577	615	1182	41	522	539	596	50	1,7
Bsu-3	533	571	607	256	10,7	532	579	614	471	20	530	545	597	35,7	1,5
Dbsu-10	450 538	554	610	522	52	478 532	576	615	181	18	471	562	615	14,3	1,4
DBsu-11	451	548	593	63	42	479	574	610	27,3	18	464	544	602	2,7	1,8

Примітки: $\lambda_{\text{полл}}$, $\lambda_{\text{збф}}$, $\lambda_{\text{фл}}$ — довжина хвилі максимуму поглинання, збудження флуоресценції та випромінювання при збудженні на довжині хвилі максимуму збудження флуоресценції; I_0 — інтенсивність власної флуоресценції барвника; I — інтенсивність флуоресценції барвників у присутності біополімерів; I/I_0 — підвищення інтенсивності флуоресценції барвника в комплексах із ДНК (РНК, БСА); * — виявляється у вигляді плеча.

димерних стирилціанінів із двома тетраалкіламонійними групами в складі лінкеру підвищення інтенсивності флуоресценції барвників у присутності ДНК значно більше (1413 разів для **DBos-13**) (рис. 3), ніж для мономерів, за рахунок низької інтенсивності флуоресценції вільних барвників. Винятком є барвник **DBos-12** ($I/I_0 = 66$), довжина його лінкеру найкоротша — 10 атомів. Для димеру **DBos-13** було проведено флуоресцентне титрування ДНК (рис. 4). Як видно з графіка, зростання інтенсивності флуоресценції в присутності ДНК спостерігається в інтервалі концентрацій від 1 до 100 $\mu\text{г}/\text{мл}$ ДНК. На основі цього графіка було оцінено константу зв'язування барвника з ДНК ($K_{\text{зв}}$), що становить $1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Бензотіазольні стирилціаніни **Bsu**-серії із

замісниками в 6 положенні бензотіазольного ядра мають набагато менші значення підвищення інтенсивності флуоресценції в присут-

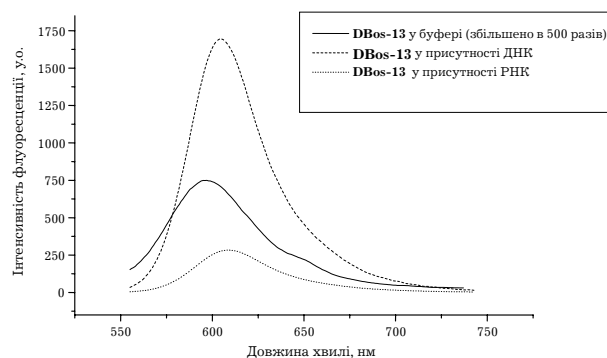


Рис. 3. Спектри флуоресценції барвника **DBos-13** у вільному стані та в присутності нуклеїнових кислот (у.о. — умовні одиниці).

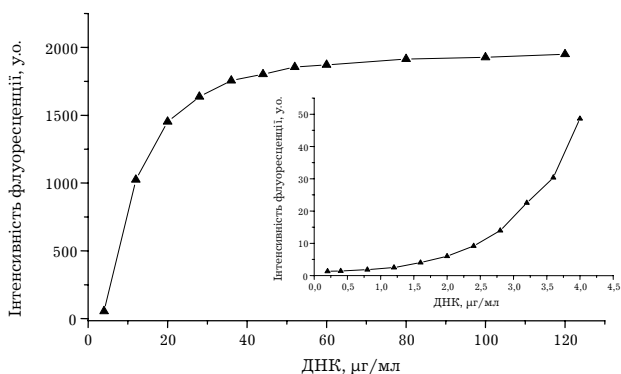


Рис. 4. Флуоресцентне титрування барвника **DBos-13** нативною ДНК (у.о. — умовні одиниці).

ності ДНК, ніж стирилціаніни **Bos**-серії із замісниками в 3 положенні бензотіазольного ядра. Так, для барвників **Bsu-1**, **Bsu-2** і **Bsu-3** значення I/I_0 становлять 10,5, 35 і 10,7 відповідно. Димер **DBsu-10** із двома тетраалкіламонійними групами в складі лінкеру, на відміну від димеру **DBsu-11** з аліфатичним лінкером, має більшу інтенсивність флуоресценції (522 у.о.).

Підвищення інтенсивності флуоресценції для барвника **Fam** із тетраметиламонійною ефекторною групою на порядок більше, ніж для барвника **F** (дані не наведено).

Спектральні властивості барвників у присутності БСА. Спектральні характеристики барвників у присутності БСА подано в табл. 2. Максимуми спектрів поглинання досліджуваних стирилціанінів у присутності БСА знаходяться в тому ж спектральному діапазоні, що й відповідні максимуми вільних барвників. Для димерних ціанінів максимуми

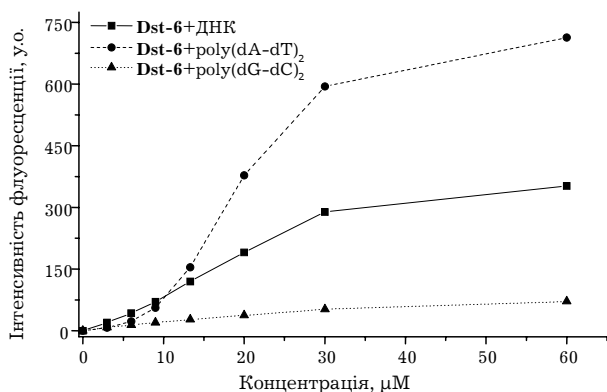


Рис. 5. Титрування барвника **Dst-6** полінуклеотидами та нативною ДНК (у.о. — умовні одиниці).

поглинання зсунуті в короткохвильову область на 20-40 нм порівняно з максимумами відповідних мономерів, що свідчить про наявність агрегатів у присутності БСА.

Максимуми збудження флуоресценції барвників розташовані в діапазоні 540-602 нм (для **Fam** — 479 нм). Максимуми флуоресценції комплексів досліджуваних барвників із БСА знаходяться в межах 596-302 нм (для **DBsu-10** на 615 нм). Інтенсивність флуоресценції стирилціанінів у присутності БСА знаходиться в межах 11,6-35,7 у.о. Підвищення інтенсивності флуоресценції для більшості барвників у присутності БСА досить незначне — до двох разів (максимальне для барвника **DBos-13** — 9,7 разів).

Вивчення механізму зв'язування стирилціанінів із длДНК. Механізм зв'язування стирилціаніну **F** із длДНК уперше дослідив Кумар. Він з'ясував, що барвник **F** вбудовується в малу борозенку ДНК [4]. Для дослідження механізму зв'язування димерних стирилціанінів із длДНК ми провели флуоресцентні титрування барвників полінуклеотидами. З кривих титрування димерного стирилціаніну **Dst-6** (рис. 5) видно, що барвник має значну специфічність до АТ-последовностей. Було проведено титрування комплексів барвник-ДНК гасником флуоресценції — йодидом калію. Щоб виключити вплив сольового ефекту, аналогічне титрування було проведено хлоридом калію. Падіння інтенсивності флуоресценції в присутності йодид-йона було значно більшим, ніж у присутності хлорид-йона (рис. 6). На основі наведених даних можна припустити, що барвник **Dst-6** взаємодіє з ДНК за борозенковим механізмом.

Для димерів **DBsu-10** та **DBos-13** було виконано флуоресцентне титрування полінуклеотидами (табл. 3). З'ясувалось, що димер **DBsu-10**, лінкер якого приєднаний у 6 положенні бензотіазольного ядра, проявляє специфічність до АТ-последовностей, що є свідченням борозенкового механізму. Димер **DBos-13**, лінкер якого приєднаний у 3 положенні бензотіазольного ядра, не проявляє специфічності до АТ- чи GC-последовностей, що вказує на інтеркаляційний механізм взаємодії.

Візуалізація клітин in vivo. Для дослідження здатності стирилціанінових барвників

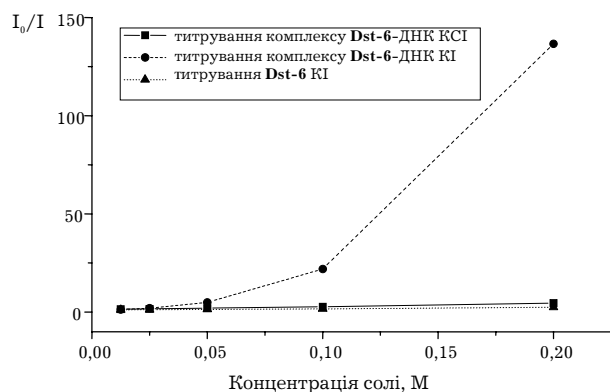


Рис. 6. Титрування барвника **Dst-6** KI та KCl в присутності ДНК і KI за відсутності ДНК.

проникати у живі клітини та специфічно зв'язуватися з нуклеїновими кислотами зі значним підвищенням інтенсивності флуоресценції клітини культури гіпокампу низької щільності інкубували з **Dbt-10**, **Bos-4**, **DBsu-10**, **Dst-6**, **Bos-12** і **DBos-13** та візуалізували за допомогою оптичної системи Till Photonics. Довжина хвилі збудження становила 525 нм (510 нм для **Dst-6**).

Було показано, що всі досліджувані барвники проникають у клітину та зв'язуються з деякими внутрішньоклітинними компонентами, очевидно, нуклеїновими кислотами, ефективно підвищуючи інтенсивність флуоресценції. На рис. 7, 8 наведено трансмісійне та флуоресцентне зображення клітин культури гіпокампу, які дають змогу побачити розподіл стирилціаніну **Bos-12** і димерного стирилціаніну **DBos-13** в клітині. Розташування найбільш яскравих флуоресціюючих компартментів відповідає розташуванню ядра на трансмісійному зображенні. Гетерогенність забарвлення ядра свідчить про проникнення

Таблиця 3
Інтенсивність флуоресценції барвників у присутності полінуклеотидів

Барвник	I^{AT} , у.о	I^{GC} , у.о
DBos-13	1455	1445
DBsu-10	729	82

Примітки: I^{AT} — інтенсивність флуоресценції барвників у присутності poly(dA-dT)"poly(dA-dT); I^{GC} — інтенсивність флуоресценції барвників у присутності poly(dG-dC)"poly(dG-dC); у.о. — умовні одиниці.

барвника через ядерні пори. У випадку **Bos-12** (рис. 8) можна легко ідентифікувати ядро, що яскраво флуоресціює. Ми вважаємо, що барвники цієї серії можна застосовувати для селективної візуалізації нуклеїнових кислот *in vivo*, наприклад, для визначення апоптичних клітин.

Висновки. Синтезовано серію нових мономерних і димерних стирилціанінів на основі (*n*-диметиламіностирил)бензотіазолу та досліджено їх спектрально-люмінесцентні властивості в присутності НК і БСА. Було показано, що ефекторні групи з тетраалкіламонійним фрагментом значно покращують взаємодію барвника з ДНК. Досліджено механізм взаємодії барвників із длДНК та агрегаційні процеси в розчинах стирилціанінів. Показано, що димери **DBsu-10** і **DBsu-11**, лінкер яких приєднаний у 6 положенні ядра бензотіазолу, в присутності ДНК підвищують інтенсивність флуоресценції в 40 і 50 разів відповідно, а димери, лінкер яких приєднаний у 3 положенні ядра бензотіазолу, проявляють ДНК-специфічність та підвищують інтенсивність флуоресценції в комплексах барвник-ДНК більш ніж на 3 порядки.

Показано, що барвники **Bos-12** і **DBos-13** здатні проникати в живі клітини та селективно взаємодіяти з клітинними компартментами, які містять нуклеїнові кислоти, зі значним підвищенням інтенсивності флуоресценції.

Одержані барвники можуть використовуватися як зонди для флуоресцентної візуалізації нуклеїнових кислот у живих клітинах та для детекції ДНК у розчині.

Експериментальна частина. Стирилціаніни синтезовано за методиками, наведеними нижче. Структури синтезованих барвників підтверджено ^1H -ЯМР-аналізом.

Методика 1. Суміш 1,27 мл (0,01 моль) 2-метил-1,3-бензотіазолу і 0,03 моль дийодалкану в 5 мл діоксану кип'ятили впродовж 8 годин. Одержану сіль висаджували діетиловим ефіром та фільтрували. Осад промивали ізопропіловим спиртом та ефіром.

Методика 2. Суміш 0,001 моль четвертинної солі та 0,001 моль *n*-диметиламінобензальдегіду в 3 мл оцтового ангідриду кип'ятили 10 хвилин. Барвник висаджували діетиловим ефіром і фільтрували. Осад промивали ізо-

пропіловим спиртом і перекристалізували з метанолу.

Методика 3. До суміші 0,0005 моль стирилу з йодалкільною ніжкою (SI-n) у 2 мл ДМФА додавали 0,35 мл (0,0007 моль) 2 молярного розчину триметиламіну та залишали на 12 годин при кімнатній температурі. Далі реакційну суміш витримували 30 хвилин при 50 °С та висаджували ефіром. Барвник відфільтровували та перекристалізували з суміші ДМФА-етанол.

Методика 4. Суміш 0,295 г (0,0005 моль) (SI-4) та 0,21 г (0,00125 моль) N,N,N',N'-тетраметил-1,4-фенілендіаміну в 2 мл ДМФА гріли на киплячій водяній бані впродовж 10 годин. Реакційну суміш охолоджували, осад відфільтровували і промивали ізопропіловим спиртом та ефіром.

Методика 5. До розчину 0,295 г (0,0005 моль) (SI-4) у 3 мл ДМФА додавали 0,06 мл (0,0007 моль) піридину та протягом години гріли на киплячій водяній бані. Барвник висаджували ефіром, фільтрували й перекристалізували з суміші ДМФА-етанол.

Методика 6. Суміш 0,97 мл (0,01 моль) 4-метилпіридину та 3,3 мл (0,025 моль) 1,4-дійодбутану в 5 мл діоксану кип'ятили 8 годин. Одержану сіль висаджували діетиловим ефіром та фільтрували. Осад промивали ізопропіловим спиртом та ефіром.

Методика 7. До розчину 0,001 моль одержаної четвертинної солі в 2 мл ДМФА додавали 0,75 мл (0,0015 моль) 2 М розчину триметиламіну та залишали на 12 годин при кімнатній

температурі. Далі реакційну суміш витримували 30 хвилин при 50 °С, висаджували ефіром та фільтрували.

Методика 8. Суміш 0,001 моль 4-метил-1-(4-триметиламоніобутил)піридиній дийодиду, 0,0011 *n*-диметиламінобензальдегіду та 5 крапель піперидину в 4 мл *n*-бутилового спирту кип'ятили 2 години. Осад відфільтровували, промивали ізопропіловим спиртом та діетиловим ефіром. Одержані барвники перекристалізували з метанолу.

Методика 9. Суміш 1,6 мл (0,01 моль) 2,3,3-триметиліндолініну та 3,0 г (0,01 моль) броміду 3-бромпропіл(триетил)амонію сплавляли впродовж 5 годин при 130 °С. Потім додавали 5 мл діоксану та кип'ятили 3 години. Одержану сіль висаджували діетиловим ефіром та фільтрували. Осад промивали ізопропіловим спиртом та ефіром.

Методика 10. До розчину 0,5 г (0,003 моль) 6-аміно-2-метилбензотіазолу в 1,5 мл піридину додавали 0,23 мл (0,0033 моль) ацетил хлориду й кип'ятили 5 хвилин. Після охолодження продукт висаджували водою, фільтрували та перекристалізували зі спирту.

Методика 11. До киплячого розчину 0,3 г (0,003 моль) янтарного ангідриду в 10 мл бензолу додавали 0,5 г (0,003 моль) 2-метил-6-амінобензотіазолу. Після охолодження продукт реакції фільтрували, промивали бензолом і висушували. До суспензії 0,53 г (0,002 моль) одержаної речовини в 1 мл ДМФА при 400 °С додавали 0,36 г (0,0022 моль) КДІ. Через 12 годин

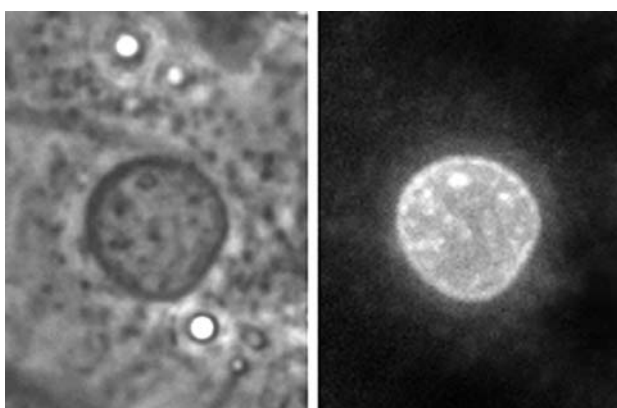


Рис. 7. Трансмісійне та флуоресцентне зображення клітин культури гіпокампу низької щільності, пофарбованих DBos-13 (час інкубації — 135 хвилин, концентрація DBos-13 — 40 μ M). Довжина хвилі збудження — 525 нм, \times 400.

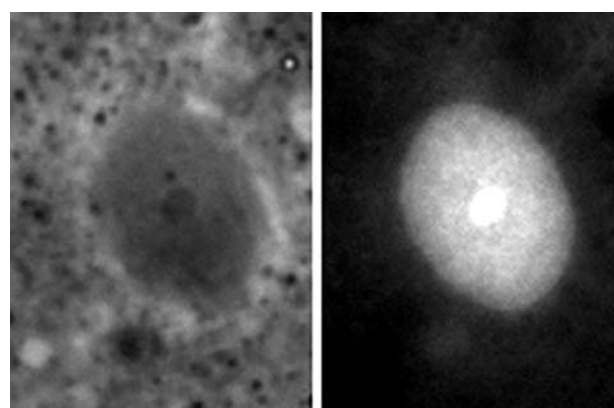


Рис. 8. Трансмісійне та флуоресцентне зображення клітин культури гіпокампу низької щільності, пофарбованих Bos-12 (час інкубації — 135 хвилин, концентрація Bos-12 — 40 μ M). Довжина хвилі збудження — 525 нм, \times 400.

реакційну суміш заливали водою, осад фільтрували та перекристалізували зі спирту.

Методика 12. Суміш (0,001 моль) ацетильного похідного 2-метил-6-амінобензотіазолу, 0,11 мл (0,0011 моль) диметилсульфату та 1 мл ДМФА нагрівали при 110 °С упродовж 5 годин. Продукт висаджували діетиловим ефіром та фільтрували.

Методика 13. До розчину 0,0005 моль (**SI-n**) в 4 мл ДМФА додавали 0,00026 моль відповідного N,N,N',N'-тетраметилдіамінобутану та гріли протягом 10 годин на киплячій водяній бані. Реакційну суміш охолоджували, осад відфільтровували, промивали метиловим спиртом та ефіром.

Методика 14. Суміш 0,48 г (0,002 моль) хлорацетильного похідного 2-метил-6-амінобензотіазолу, 0,18 мл (0,001 моль) N,N,N',N'-тетраметилдіамінобутану та 1 мл ДМФА нагрівали при 100 °С 5 годин. Продукт висаджували діетиловим ефіром та фільтрували. 0,52 г (0,0009 моль) одержаної димерної солі та 0,95 мл (0,001 моль) диметилсульфату в 2 мл ДМФА нагрівали при температурі 115 °С упродовж 7 годин. Продукт висаджували діетиловим ефіром та фільтрували.

Методика 15. Суміш із 0,36 г (0,0005 моль) димерної четвертинної солі (**S-3**) та 0,16 г (0,0011 моль) *n*-диметиламінобензалдегіду в 3 мл оцтового ангідриду кип'ятили 10 хвилин, висаджували діетиловим ефіром і фільтрували. Одержаний осад розчиняли в метанолі та додавали 0,67 г насиченого водного розчину KI. Барвник відфільтровували, промивали спиртом і водою.

Методика 16. До розчину 0,42 г (0,0025 моль) 2-метил-6-амінобензотіазолу в 2 мл піридину додавали 0,29 г (0,0013 моль) дихлоангідриду нонандикарбонової кислоти та кип'ятили 10 хвилин. Після охолодження продукт висаджували водою, фільтрували та перекристалізували зі спирту. 0,43 г (0,0009 моль) одержаної димерної солі та 0,95 мл (0,001 моль) диметилсульфату в 2 мл ДМФА упродовж 7 годин нагрівали при 115 °С. Продукт висаджували діетиловим ефіром та фільтрували.

¹H-ПМР-спектри

синтезованих стирилціанінів*

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3,3-диметил-1-(3-триетиламоніопропіл)-3Н-

індолій дийодид (**Boi**). Вихід 87 %; T_{пл} 192-193 °С; ¹H-ПМР (ДМСО-d₆): 1.25 (9H, м), 1.79 (6H, с), 2.13 (2H, м), 3.21 (6H, с), 3.30 (6H, кв, J=7.2), 3.56 (2H, м), 4.63 (2H, м), 6.91 (2H, д, J=8.0), 7.28 (1H, д, J=15.3), 7.50 (1H, м), 7.59 (1H, м), 7.84 (2H, м), 8.18 (2H, д, J=8.0), 8.41 (1H, д, J=15.3).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-(3-диметиламоніопропіл)-1,3-бензотіазол-3-ій дийодид (**Bos-3**). Вихід 83 %; T_{пл} 255-257 °С; ¹H-ПМР (ДМСО-d₆): 2.29 (2H, м), 2.77 (6H, с), 3.13 (6H, с), 3.37 (2H, уш. т, J=7.2), 4.98 (2H, уш. т, J=7.5), 6.83 (2H, д, J=8.7), 7.66-7.84 (3H, м), 8.02-8.17 (3H, м), 8.27 (1H, д, J=8.3), 8.34 (1H, д, J=8.1), 11.09 (1H, уш. с).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-[3-(1-піридиніл)пропіл]-1,3-бензотіазол-3-ій дийодид (**Bos-4**). Вихід 86 %; T_{пл} 279-280 °С із розкл.; ¹H-ПМР (ДМСО-d₆): 2.58 (2H, м), 3.15 (6H, с), 4.86 (2H, т, J=7.5), 4.96 (2H, т, J=6.3), 6.88 (2H, д, J=8.8), 7.54 (1H, д, J=15.1), 7.71 (1H, т, J=7.5), 7.81 (1H, т, J=7.8), 7.93 (2H, д, J=8.5), 8.10-8.20 (4H, м), 8.33 (1H, д, J=8.5), 8.63 (1H, т, J=7.8), 9.09 (2H, д, J=5.9).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-(3-триметиламоніопропіл)-1,3-бензотіазол-3-ій дийодид (**Bos-5**). Вихід 81 %; T_{пл} 285-287 °С із розкл.; ¹H-ПМР (ДМСО-d₆): 2.31 (2H, м), 3.10 (9H, с), 3.14 (6H, с), 3.62 (2H, м), 4.85 (2H, т, J=7.3), 6.87 (2H, д, J=8.3), 7.58 (1H, д, J=15.1), 7.71 (1H, т, J=7.5), 7.82 (1H, т, J=7.5), 7.98 (2H, д, J=8.3), 8.12-8.23 (2H, м), 8.35 (1H, д, J=7.8).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-(4-триметиламоніобутил)-1,3-бензотіазол-3-ій дийодид (**Bos-6**). Вихід 88 %; T_{пл} 261-263 °С із розкл.; ¹H-ПМР (ДМСО-d₆): 1.83 (2H, м), 1.98 (2H, м), 3.08 (9H, с), 3.13 (6H, с), 3.39 (2H, м), 4.84 (2H, т, J=6.8), 6.86 (2H, д, J=8.8), 7.61 (1H, д, J=15.1), 7.70 (1H, т, J=7.8), 7.80 (1H, т, J=7.8), 7.97 (2H, д, J=8.8), 8.12 (1H, д, J=15.6), 8.20 (1H, д, J=8.3), 8.34 (1H, д, J=7.8).

3-{4-[4-Диметиламінофеніл(диметил)амоніо]бутил}-2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій дийодид (**Bos-12**). Вихід 84 %; T_{пл} 209-211 °С із розкл.; ¹H-ПМР (ДМСО-d₆): 1.60 (2H, м), 1.74 (2H, м), 2.95 (6H, с), 3.14 (6H, с), 6.52 (6H, с), 3.87 (2H, т, J=7.5), 4.74 (2H, т, J=7.2), 6.74 (2H, д, J=9.3), 6.86 (2H, д, J=9.0), 7.52 (1H, д, J=15.3), 7.60 (2H, д, J=9.3), 7.69 (1H, т, J=7.5), 7.77 (1H, т, J=7.8), 7.89-7.98 (2H, м), 8.03-8.14 (2H, м), 8.31 (1H, д, J=8.1).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-{3-[2-[3-{2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій-3-іл}пропіл(диметил)амоніо]гексил(диметил)амоніо]пропіл}-1,3-бензотіазол-3-ій тетраїодид (**DBos-10**). Вихід 71 %; $T_{\text{пл}}$ 238-241 °C із розкл.; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 1.29 (4H, м), 1.75 (4H, м), 2.29 (4H, м), 3.07 (12H, с), 3.11 (12H, с), 3.30 (4H, м), 3.70 (4H, м), 4.88 (4H, м), 6.83 (4H, д, $J=7.8$), 7.61 (2H, д, $J=14.6$), 7.71 (2H, т, $J=7.2$), 7.81 (2H, т, $J=7.3$), 8.02 (4H, д, $J=7.3$), 8.15 (2H, д, $J=14.6$), 8.27 (2H, д, $J=7.3$), 8.35 (2H, д, $J=7.3$).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-{3-[2-[3-{2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій-3-іл}пропіл(диметил)амоніо]пропіл(диметил)амоніо]пропіл}-1,3-бензотіазол-3-ій тетраїодид (**DBos-11**). Вихід 65 %; $T_{\text{пл}}$ 233-235 °C із розкл.; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 2.32 (6H, м), 3.09 (12H, с), 3.16 (12H, с), 3.31 (4H, м), 3.82 (4H, м), 4.87 (4H, м), 6.80 (4H, д, $J=7.8$), 7.61 (2H, д, $J=15.6$), 7.71 (2H, т, $J=7.3$), 7.80 (2H, т, $J=7.4$), 8.03 (4H, д, $J=7.8$), 8.15 (2H, д, $J=15.1$), 8.29 (2H, д, $J=8.7$), 8.34 (2H, д, $J=7.8$).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-{3-[2-[3-{2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій-3-іл}пропіл(диметил)амоніо]етил(диметил)амоніо]пропіл}-1,3-бензотіазол-3-ій тетраїодид (**DBos-12**). Вихід 62 %; $T_{\text{пл}}$ 237-238 °C із розкл.; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 2.24 (4H, м), 3.03 (12H, с), 3.35 (12H, с), 3.77 (4H, м), 4.11 (4H, с), 4.73 (4H, уш. т, $J=7.1$), 6.64 (4H, д), 7.48 (2H, д, $J=14.9$), 7.67 (2H, т, $J=7.7$), 7.75 (2H, т, $J=7.6$), 7.85 (4H, д, $J=8.7$), 8.02 (2H, д, $J=15.3$), 8.17 (2H, д, $J=8.2$), 8.24 (2H, д, $J=8.1$).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-{5-[3-[5-{2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій-3-іл}пентил(диметил)амоніо]пропіл(диметил)амоніо]пентил}-1,3-бензотіазол-3-ій тетраїодид (**DBos-13**). Вихід 73 %; $T_{\text{пл}}$ 181-183 °C; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 1.46 (4H, м), 1.76 (4H, м), 1.87 (4H, м), 2.13 (2H, м), 3.03 (12H, с), 3.09 (12H, с), 3.28 (8H, м), 4.86 (4H, уш. т, $J=6.8$), 6.81 (4H, д, $J=8.6$), 7.61 (2H, д, $J=14.6$), 7.68 (2H, т, $J=7.8$), 7.77 (2H, т, $J=7.5$), 7.95 (4H, д, $J=8.2$), 8.08 (2H, д, $J=15.1$), 8.16 (2H, д, $J=8.2$), 8.32 (2H, д, $J=7.8$).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-{5-[6-[5-{2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-1,3-бензотіазол-3-ій-3-іл}пентил(диметил)амоніо]гексил(диметил)амоніо]гексил(диметил)амоніо]пентил}-1,3-бензотіазол-3-ій тетраїодид (**DBos-14**). Вихід 68 %; $T_{\text{пл}}$ 264-266 °C із розкл.; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 1.36 (4H, м), 1.51 (4H, м), 1.71 (4H, м), 1.79 (4H, м), 1.90 (4H, м), 3.04 (12H, с), 3.11 (12H, с), 3.29 (8H, м), 4.88 (4H, т, $J=6.8$), 6.78 (4H, д, $J=8.8$), 7.59-7.70 (4H, м), 7.76 (2H, т, $J=7.5$), 7.95 (4H, д, $J=8.8$), 8.05 (2H, д, $J=15.1$), 8.18 (2H, д, $J=8.8$), 8.30 (2H, д, $J=7.8$).

4-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-1-(4-триметиламоніобутил)піридиній дийодид (**Fam**). Вихід 74 %; $T_{\text{пл}}$ 224-225 °C із розкл.; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 1.70 (2H, м), 1.90 (2H, квінт, $J=7.0$), 3.02 (6H, с), 3.05 (9H, с), 3.34 (2H, м), 4.47 (2H, т, $J=6.8$), 6.79 (2H, д, $J=8.8$), 7.20 (1H, д, $J=16.1$), 7.60 (2H, д, $J=8.8$), 7.96 (1H, д, $J=16.1$), 8.10 (2H, д, $J=6.8$), 8.78 (2H, д, $J=6.80$).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-метил-6-метилкарбоксамідо-1,3-бензотіазол-3-ій йодид (**Bsu-1**). Вихід 84 %; $T_{\text{пл}}$ >300 °C; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 2.13 (3H, с), 3.08 (6H, с), 4.18 (3H, с), 6.80 (2H, д, $J=8.7$), 7.55 (1H, д, $J=15.6$), 7.73 (1H, уш. д, $J=8.7$), 7.86 (2H, д, $J=8.7$), 7.92 (1H, д, $J=15.3$), 8.01 (1H, д, $J=9.0$), 8.66 (1H, д, $J=1.2$), 10.47 (1H, с).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-метил-6-триметиламоніометилкарбоксамідо-1,3-бензотіазол-3-ій дийодид (**Bsu-2**). Вихід 82 %; $T_{\text{пл}}$ >300 °C; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 3.12 (6H, с), 3.34 (9H, с), 4.21 (4H, с), 4.43 (2H, с), 6.85 (2H, д, $J=8.3$), 7.61 (1H, д, $J=15.6$), 7.77 (1H, д, $J=8.3$), 7.91 (2H, д, $J=7.8$), 8.02 (1H, д, $J=15.6$), 8.09 (1H, д, $J=8.5$), 8.67 (1H, с), 11.01 (1H, с).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-6-(2,5-діоксотетрагідро-1H-1-піроліл)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій йодид (**Bsu-3**). Вихід 86 %; $T_{\text{пл}}$ 214-216 °C із розкл.; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 2.85 (4H, с), 3.12 (6H, с), 4.23 (3H, с), 6.86 (2H, д, $J=7.5$), 7.66 (2H, м), 7.93 (2H, д, $J=7.5$), 8.09 (1H, д, $J=14.6$), 8.19 (1H, д, $J=8.3$), 8.26 (1H, с).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-6-[4-[2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-6-ілкарбамоїлметил(диметил)амоніо]бутил(диметил)амоніометилкарбоксамідо]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій тетраїодид (**DBsu-10**). Вихід 74 %; $T_{\text{пл}}$ 221-222 °C із розкл.; ^1H -ПМР (ДМСО- d_6): 1.90 (4H, м), 3.10 (12H, с), 3.34 (12H, с), 3.70 (4H, м), 4.19 (6H, с), 4.47 (4H, с), 6.81 (4H, д, $J=8.8$), 7.53 (2H, д, $J=15.1$), 7.79-7.90 (6H, м),

7.93 (2H, д, $J=14.6$), 8.05 (2H, д, $J=8.8$), 8.59 (2H, с), 11.28 (2H, с).

2-[2-(4-Диметиламінофеніл)-1-етеніл]-6-(7-{2-[2-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл]-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій-6-ілкарбамоїл}-гентилкарбоксамідо)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-ій дийодид (**DBsu-11**). Вихід 69 %; $T_{пл}$ 245 °C з розкл.; 1H -ПМР (ДМСО- d_6): 1.34 (6H, м), 1.62 (4H, м), 2.36 (4H, т, $J=6.8$), 3.03 (6H, с), 4.13 (6H, с), 6.74 (4H, д, $J=8.3$), 7.47 (2H, д,

$J=15.6$), 7.70 (2H, д, $J=8.8$), 7.76-7.89 (6H, м), 7.97 (2H, д, $J=8.8$), 8.65 (2H, с), 10.38 (2H, с).

Скорочення: *наведені положення (м.ч.), інтенсивність сигналу, його форма (с — синглет, д — дублет, уш. д — уширений дублет, т — триплет, уш. т — уширений триплет, квінт — квінтет, м — мультиплет), константа спінової взаємодії (Гц).

Надійшла до редакції 11.05.2006 р.

Novel styrylcyanines and their dimers as fluorescent dyes for nucleic acids detection: synthesis and spectral-luminescent studies

A.O. Balanda, K.D. Volkova, V.B. Kovalska, M.Yu. Losytskyu, S.S. Lukashov, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine

Abstract. With the aim to design DNA-sensitive fluorescent probes, a series of novel (*p*-dimethylaminostyryl) benzothiazolium dyes with tetraalkylammonium residues were synthesized. Spectral-luminescent properties of obtained dyes in free state and in the presence of nucleic acids and BSA (bovine serum albumin) were studied. It was shown that dimeric styrylcyanines with linker containing two tetraalkylammonium residues demonstrated 3 orders of magnitude fluorescence increase in the presence of DNA. The interaction mechanism between synthesized styrylcyanines and dsDNA was studied and possible binding mechanism was suggested. The possibility to use styrylcyanines as probes for fluorescent nucleic acids *in vivo* visualization was revealed.

Key words: styrylcyanine dyes, nucleic acids detection.

Перелік літератури

- Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research products, 9th ed. Eugene: Molecular Probes Inc., 2002.
- Turro N., Gratzel M., Braun A. Angew. Photophysical and photochemical processes in micellar systems // Chem. Int. Ed. Engl. — 1980. — Vol. 19, No 9. — P. 675-696.
- UK Patent Application, 2074340 A, 1981.
- Kumar C., Turner R., Ascuncion E. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chem. — 1993. — Vol. 74, No 1-2. — P. 231-238.
- Kovalska V.B., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Losytskyu M.Yu., Tokar V.P., Yarmoluk S.M. Fluorescent homodimer styrylcyanines: synthesis and spectral-luminescent studies in nucleic acids and protein complex // Dyes and Pigments. — 2005. — Vol. 67. — P. 47-54.
- Kovalska V.B., Kocheshev I.O., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Yarmoluk S.M. Studies on the spectral-luminescent properties of the novel homodimer styryl dyes in complexes with DNA // Journal of Fluorescence. — 2005. — Vol. 15. — P. 215-219.
- Wang H.Z., Lei H., Wei Z.C., Zhao F.L., Zheng X.G., Xu N.S., Wang, Ren Y., Tian Y.P., Fang Q., Jiang M.H. Spectral properties and effective upconverted lasing of new organic molecules // Chemical Physics Letters. — 2000. — Vol. 324. — P. 349-353.
- Wu L.Z., Tang X.J., Jiang M.H., Tung C.H. Two-photon induced fluorescence of novel dyes // Chemical Physics Letters. — 1999. — Vol. 315. — P. 379-382.
- Stiel H., Teuchner K., Paul A., Fveyer W., Leupold D. Two-photon excitation of alkyl-substituted magnesium phthalocyanine: radical formation via higher excited states // Journal of Photochemistry and Photobiology. A: Chem. — 1994. — Vol. 80, No 1-3. — P. 289-298.
- Konig K., Simon U., Halbhuber K.J. 3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope // Cell. Mol. Biol. — 1996. — Vol. 42. — P. 1181-1194.
- Stelzer E.H.K., Shell S., Stricker R., Pick R., Storz C., Ritter G., Salmon N. Nonlinear absorption extends confocal fluorescence microscopy into the ultraviolet regime and confines the illumination volume // Opt. Commun. — 1994. — Vol. 104. — P. 223-228.
- Kovalska V.B., Losytskyu M.Yu., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Tokar V.P., Yarmoluk S.M. Synthesis of novel fluorescent styryl dyes based on the imidazol[1,2-*a*]pyridinium chromophore and their spectral-fluorescent properties in the presence of nucleic acids and proteins // Dyes and Pigments. — 2006. — Vol. 68. — P. 39-45.
- Ohulchanskyi T.Y., Pudavar H.E., Yarmoluk S.M., Yaschuk V.M., Bergey E.J., and Prasad N. A monomethine cyanine dye Cyan 40 for two-photon-excited fluorescence detection of nucleic acids and their visualization in live cells // Photochemistry and Photobiology. — 2003. — Vol. 77, No 2. — P. 138-145.
- Rye H.S., Yue S., Wemmer D.E., Quesada M.A., Haugland R.P., Mathies R.A., and Glazer A.N. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications // Nucleic Acids Reserch. — 1992. — Vol. 20. — P. 2803.