

УДК 543.4+544.164+577.113+577.323+547.6+547.7

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ДНК-ЗОНДЫ: ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ И СПОСОБОВ ПРИМЕНЕНИЯ

В. С. Сибирцев^{1,*}, А. В. Гарабаджиу², академик РАН **В. И. Швец**^{2,3}

Поступило 22.06.2019 г.

Описаны результаты многолетних авторских исследований оптических и комплексообразующих свойств более 30 синтетических низкомолекулярных флуорофоров, специфичных к ДНК. Эти исследования позволили существенно расширить уже имеющуюся базу данных свойств подобных соединений, а также уточнить представления о закономерностях, связывающих свойства флуорофоров с их структурой, и сформулировать рекомендации по конструированию новых, эффективных, специфичных к ДНК флуорофоров. Результаты этих исследований могут быть использованы, в частности, при разработке новых экспрессных методов диагностики различных заболеваний, биотестирования про- и антибиотических свойств различной продукции и отходов и т.п.

Ключевые слова: флуорофоры на ДНК, оптический анализ, ДНК анализ, биотестирование.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524895530-534>

Всё более актуальной в настоящее время становится проблема разработки экспрессных, объективных и доступных для широкого применения методов мониторинга токсикобезопасности различной продукции и отходов человеческой жизнедеятельности. Одним же из важнейших параметров, характеризующих нелетальные изменения состояния любой биотестовой системы, являются изменения в структуре её клеточного генома. При этом если таковые изменения касаются первичной структуры хромосомальной ДНК, то они передаются по наследству дочерним клеткам. Общее количество хромосомальной ДНК в пробе коррелирует с общим количеством клеток, присутствующих в биотестовой системе. А изменения пространственной структуры генома отражаются на характере биосинтеза белков и таким образом регулируют активность метаболизма рассматриваемой биотестовой системы. В связи с этим перспективным представлялось разработать метод, позволяющий достаточно экспрессно, объективно и чувствительно оценивать изменения, происходящие в структуре генома тестовых организмов в результате их взаимодействия с различными внешними химическими и физическими факторами. Этот метод предусматривал использование системы из несколь-

ких синтетических низкомолекулярных соединений, обладающих взаимодополняющими оптическими и комплексообразующими свойствами, позволяющими рассматриваемым соединениям существенно увеличивать свой квантовый выход флуоресценции при специфическом взаимодействии с ДНК, осуществлять резонансный перенос энергии с одного флуорофора на другой и т.п. И первым этапом разработки этого метода стал анализ уже имеющихся литературных данных по структурам и свойствам подобных соединений, а также собственные многолетние исследования свойств более чем 30 синтетических, потенциально специфичных к ДНК флуорофоров. При этом большая часть таких флуорофоров (являвшихся производными фенилиндольного, фенилбензолного, бисбензимидазолного, псораленового, ангелицинового, тетрагидрокарбазольного, оксофеноксазолного и других рядов, рис. 1) была впервые синтезирована сотрудниками Санкт-Петербургского технологического института и Российского химико-технологического университета.

Основные результаты этих исследований представлены здесь в табл. 1, а в более подробном виде описаны в работах [1–12]. Отсюда можно сделать следующие выводы. Эффективный флуорофор на ДНК должен обладать развитой системой сопряжённых связей, включающих в себя желательно:

1) несколько пяти- или шестичленных ароматических циклов (обязательно конденсированных, если конструируется интеркалятор);

2) хотя бы один гетероатом (желательно эндоциклический азот или кислород, который помимо про-

¹ФГБНУ ВНИИ пищевых добавок, филиал ФГБНУ

“ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова”

Российской Академии наук, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный

технологический институт

³МИРЭА — Российский технологический университет,

Москва

*E-mail: vs1969r@mail.ru

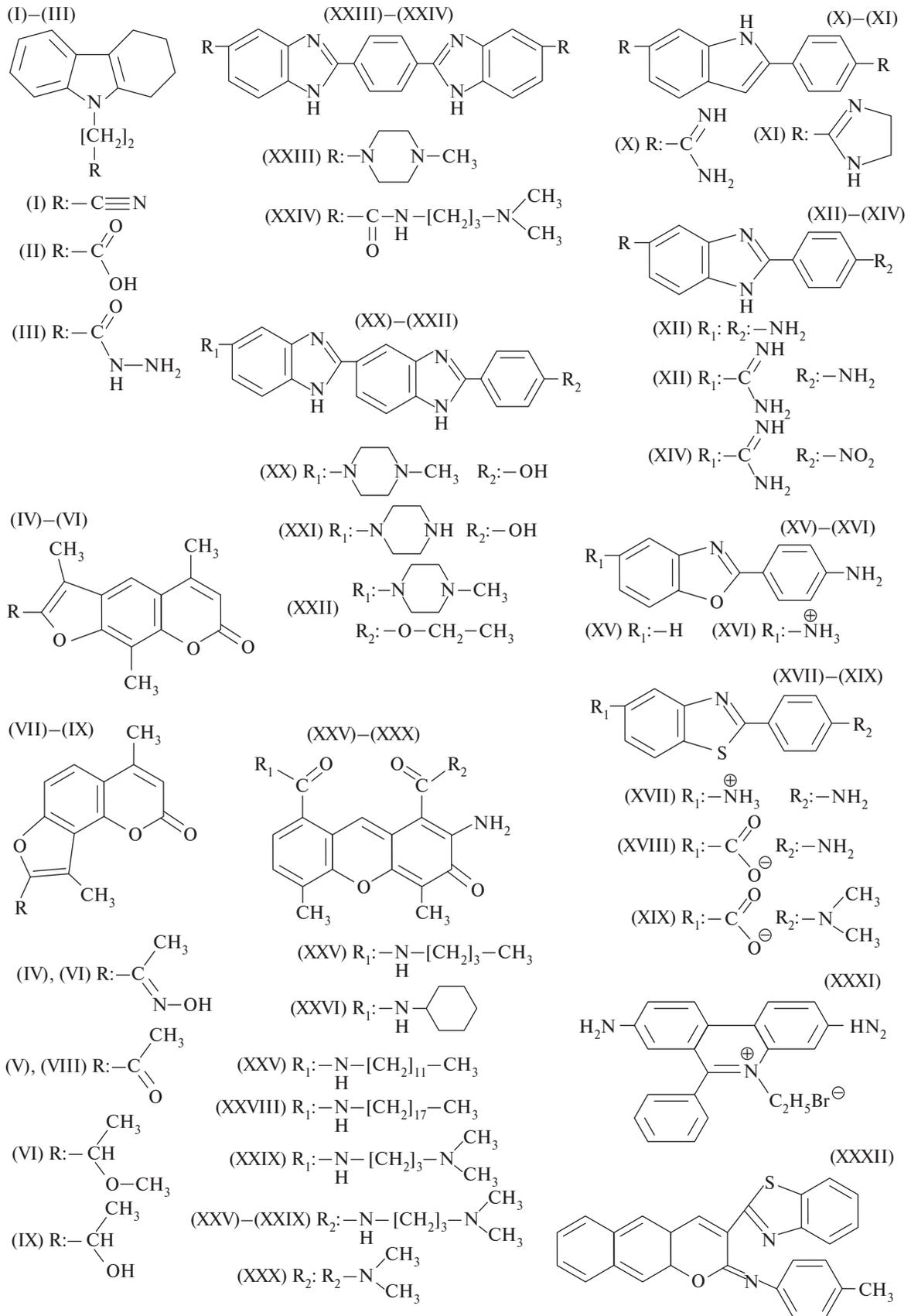


Рис. 1. Структурные формулы исследованных нами флуорофоров на ДНК.

Таблица 1. Основные оптические и комплексообразующие с ДНК свойства исследованных нами флуорофоров

Соединение	λ_{AB}^W	λ_{AB}^D	λ_{EM}^W	λ_{EM}^D	$\epsilon_W \cdot 10^{-4}$	$\Phi_W \cdot 10^3$	Φ_D/Φ_W	$K \cdot 10^{-5}$	$n \cdot 10^3$	$\eta \cdot 10^{-5}$
I	290	310	380	360	1,3	330	1,4	24	25	0,23
II	290	310	380	360	1,4	380	1,2	260	7,4	0,24
III	290	310	380	360	1,3	410	1,1	74	13	0,21
IV	330	330	455	455	0,83	96	2,4	0,19**	28**	0,35
V	330	330	455	455	0,91	130	2,1	0,18**	27**	0,31
VI	330	330	455	455	0,75	190	1,3	0,10**	24**	0,22
VII	330	330	455	455	0,93	69	3,0	0,37**	53**	0,41
VIII	330	330	455	455	0,98	100	2,4	0,35**	58**	0,33
IX	330	330	455	455	0,85	130	1,7	0,24**	63**	0,26
X	340	350	455	455	2,0	6,3	24	49	26	60
XI	355	365	465	450	1,7	7,8	32	84	6,9	36
XII	330	330	450	450	3,1	230	0,55	140	4,1	-16
XIII	330	340	455	455	1,6	4,7	24	78	6,5	7,2
XIV	330	340	455	455	0,52	3,8	23	79	6,6	7,4
XV	325	325	390	390	1,5	870	0,085	23	24	-51
XVI	340*	345*	510	510	0,60	130	0,55	25	22	-13
XVII	350*	355*	520	520	1,7	70	0,76	11	32	-7,3
XVIII	340	340	445	445	1,3	550	0,10	14	31	-32
XIX	370	370	465	465	2,6	660	0,085	12	30	-43
XX	345	355	500	455	2,7	11	44	47	8,9	49
XXI	350	355	500	455	3,6	9,1	53	46	9,1	42
XXII	345	350	495	455	2,4	13	40	45	11	61
XXIII	360	370	555	500	1,7	8,6	46	42	16	21
XXIV	330	350	400*	400*	1,3	51	10	72	8,4	43
XXV	270*	255*	470*	350*	0,68	9,3	12	1,2	61	2,1
XXVI	270*	255*	400*	350*	0,59	8,1	14	0,95	92	2,2
XXVII	270*	255*	470	350*	0,71	6,7	15	1,6	66	1,8
XXVIII	270*	255*	470	350*	0,76	13	9,2	1,3	72	2,5
XXIX	270*	255*	470*	350*	0,69	8,5	13	1,5	68	1,9
XXX	270*	255*	470*	350*	0,72	41	3,3	1,3	71	0,73
XXXI	480	520	595	605	0,56	53	10	2,5	100	4,8
XXXII	365*	365*	450*	450*	0,15	6,4	5	0,64	81	1,0

Примечание. Структурные формулы соединений I–XXXII см. на рис. 1. λ_{AB} и λ_{EM} (нм) — длины волн максимальных пиков светопоглощения и флуоресцентной эмиссии в области от 200 до 1000 нм; ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) — молярный коэффициент светопоглощения (определялся при λ_{AB}^W); Φ — квантовый выход флуоресценции; K (M^{-1}) и n — константа адсорбции и “коэффициент специфичности”, рассчитанные по модели Скэтчарда для флуоресцирующего комплекса исследуемого лиганда с *St*-ДНК в *St*-буфере; η ($M^{-1}cm^{-1}$) — “коэффициент чувствительности”, отражающий максимальное приращение интенсивности флуоресценции при увеличении концентрации на 1 моль/л (в пересчёте на пары нуклеотидов) при длине оптического пути 1 см. При этом индексами *W* и *D* обозначены значения, регистрировавшиеся в *St*-буфере в отсутствие *St*-ДНК (*W*) и в присутствии насыщающего красителя её количества (*D*). А сносками * и ** отмечены те соединения, у которых есть либо дополнительные, меньшие по интенсивности пики светопоглощения или флуоресценции в области 300–700 нм (*), либо зарегистрировано три типа обратимого специфического связывания с разными значениями *K* и *n*, преобладающие при разных соотношениях концентраций ДНК и флуорофора [7], из которых в таблице указаны значения, характерные для наиболее специфичного типа связывания (**). У соединений XXV–XXX, в отличие от остальных указанных в таблице соединений, длины волн максимальных пиков возбуждения фотофлуоресценции ($\lambda_{EX}^W = 310–330$ нм и $\lambda_{EX}^D = 290–300$ нм) отличались от λ_{AB} (вследствие наличия у этих соединений в растворе нескольких равновесных форм с разными оптическими свойствами, соотношение которых существенно менялось при изменении pH раствора), а также имелись пики светопоглощения в области 430–450 нм, лишь немного менее интенсивные, чем при 270 нм [4]. В качестве *St*-ДНК использовалась ДНК тимуса теленка, после растворения в дистиллированной воде обрабатываемая ультразвуком так, чтобы средняя масса одного полинуклеотидного фрагмента составляла 35 000 Да. А в качестве *St*-буфера использовался водный раствор с pH $7,4 \pm 0,2$, содержащий 0,01 М NaCl + 0,01 М Na_2EDTA (этилендиаминотетраацетат натрия) + 0,01 М *Tris* (2-амино-2-гидрокси-метил-1,3-пропандиол).

чего послужит центром специфического связывания флуорофора с ДНК);

3) а также один или несколько заместителей, проявляющих по отношению к хромофорной системе флуорофора в условиях, при которых будет предположительно происходить его связывание с ДНК, электроноакцепторные свойства, согласованные со степенью электронасыщенности хромофора (как в случае, например, соединений X и XI, рис. 1 и табл. 1).

Кроме того, для существенного увеличения чувствительности и специфичности по отношению к субстрату может быть сконструирован флуорофор, имеющий не один, а несколько хромофорных либо специфически взаимодействующих с ДНК фрагментов, достаточная степень сопряжения электронных систем которых будет достигаться лишь при стабилизации плоскостной структуры молекулы флуорофора в результате её специфического взаимодействия с ДНК (как в случае, например, соединений XX–XXIII, рис. 1 и табл. 1).

Также при выборе оптимальной структуры флуорофора на ДНК следует учитывать, насколько его оптические и комплексообразующие свойства будут чувствительны к изменению условий измерения и присутствию в растворе различных примесей, насколько это соединение хорошо растворимо и устойчиво в растворе и т.п.

Помимо этого следует заметить, что для практического использования важна не столько максимальная величина отношения квантовых выходов флуоресценции рассматриваемого соединения в присутствии и в отсутствие ДНК (см. Φ_D/Φ_W в табл. 1), сколько величина изменения интенсивности свечения флуорофора на единицу концентрации ДНК (см. η в табл. 1), которая существенно зависит не только от Φ_D/Φ_W , но и от Φ_W , соотношения концентраций ДНК и флуорофора в системе, а также многих других факторов.

Таким образом, осуществив представленные здесь исследования, нам удалось:

1) существенно расширить уже имеющуюся базу данных свойств синтетических низкомолекулярных флуорофоров, специфичных к ДНК;

2) уточнить представления о закономерностях, связывающих оптические и комплексообразующие свойства таких соединений с их структурой;

3) сформулировать рекомендации по конструированию новых, эффективных, специфичных к ДНК флуорофоров;

4) руководствуясь сказанным выше, подобрать ряд специфичных к ДНК флуорофоров со взаимо-

дополняющими спектральными и комплексообразующими свойствами, более подробно описанных в работах [7, 9, 10, 13].

При этом было проведено сопоставление данных, полученных для разных биообъектов (таких как различные микроорганизмы, клетки крови крыс, людей и т.п.) с помощью предлагаемых в работах [7, 9, 10, 13] систем флуорофоров, с данными, полученными для тех же биообъектов с помощью амплификации (сочетанной с полимеразной цепной реакцией) метода учёта нестабильных хромосомных aberrаций в культивируемых лимфоцитах, а также других “классических” генетико-цитологических методов, в результате этого было доказано, что предлагаемые системы флуорофоров действительно позволяют достаточно чувствительно и избирательно детектировать изменения в первичной и пространственной структуре генома исследуемых биообъектов. После чего упомянутые системы флуорофоров были использованы, в частности, при разработке новых экспрессных методов диагностики различных заболеваний, биотестирования про- и антибиотических свойств различной продукции и отходов и т.п.

Благодарности. Статья посвящается памяти академика РАН В.И. Швеца, который до последних дней своей жизни принимал деятельное участие в описываемых здесь исследованиях, но, к сожалению, из-за скоростной кончины так и не успел увидеть эту работу окончательно завершённой.

Кроме того, авторы выражают благодарность профессору РХТУ В.Ф. Травеню.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. Механизмы изменения флуоресцентных свойств бисбензимидазольных красителей // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. № 9. С. 731–736.
2. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. Спектральные свойства красителей бисбензимидазольного ряда при взаимодействии с ДНК // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. № 12. С. 969–978.
3. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В. Влияние природы гетероатома в бензозолах на их спектральные свойства // Журн. органической химии. 1997. Т. 33. № 12. С. 1840–1843.
4. Сибирцев В.С., Глибин Е.Н., Иванов С.Д. Изменения спектральных свойств производных актиноцина, обусловленные превращением равновесных форм // Журн. органической химии. 2000. Т. 36. № 12. С. 1865–1872.
5. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. Сравнительное исследование свойств ДНК-специфичных красителей индольного и бензимидазольного

- ряда // Биоорганическая химия. 2001. Т. 27. № 1. С. 64–73.
6. Сибирцев В.С., Толмачев А.Ю., Суслов В.В., Гарабаджиу А.В., Травень В.Ф. Зависимость флуоресцентных свойств соединений псораленового, ангелицинового и карбазольного рядов от характера их терминальных заместителей // Журн. органич. хим. 2003. Т. 39. № 6. С. 930–938.
 7. Сибирцев В.С. Изучение возможностей применения к анализу ДНК бифункциональной системы: бромид этидия + Хехст-33258 // Биохимия. 2005. Т. 70. № 4. С. 545–555.
 8. Сибирцев В.С., Толмачев А.Ю., Ковалева М.В., Гарабаджиу А.В., Травень В.Ф. Спектральное исследование взаимодействия с ДНК 4,8,4'-триметилпсораленов и 4,4'-диметилангелицинов // Биохимия. 2005. Т. 70. № 7. С. 995–1007.
 9. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В. Флуоресцентные ДНК-зонды: введение в теорию и практику использования. СПб.: НОУ “Экспресс”, 2006. 188 с.
 10. Сибирцев В.С. Флуоресцентные ДНК-зонды: исследование механизмов изменения спектральных свойств и особенностей практического применения // Биохимия. 2007. Т. 72. № 8. С. 1090–1106.
 11. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В. Спектральное исследование взаимодействия с ДНК бензтиазолилбенз- α -хромена // Биохимия. 2007. Т. 72. № 8. С. 1107–1116.
 12. Сибирцев В.С. Исследование механизмов изменения спектральных свойств при взаимодействии с ДНК соединений бензасольного, индольного и фенантридиумного рядов // Оптический журнал. 2017. Т. 84. № 5. С. 13–21.
 13. Сибирцев В.С. Методики биотестирования на основе флуорометрического геномного анализа // Оптич. журн. 2017. Т. 84. № 11. С. 84–89.

**FLUORESCENT DNA PROBES:
PROPERTIES STUDY AND METHODS OF APPLICATION**
V. S. Sibirtsev¹, A. V. Garabadgiu², Academician of the RAS V. I. Shvets^{2,3}

¹*FSBSI ARRI Food Additives, a Branch of the FSBSI “FSC for Food Systems named after V.M. Horbatov”,
of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation*

²*Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University),
Saint-Petersburg, Russian Federation*

³*MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russian Federation*

Received June 22, 2019

The results of long-term author's studies of the optical and complex-forming properties of more than 30 synthetic low-molecular-weight fluorophores specific for DNA are described. These studies have significantly expand the already existing database of properties of such compounds and clarify ideas about the patterns linking the mentioned properties of fluorophores with their structure, and formulate recommendations on the design of new, effective, DNA-specific fluorophores. The results of these studies can be used, in particular, in the development of new express methods for diagnosing various diseases biotesting of pro- and antibiotic properties of various products and wastes, etc.

Keywords: DNA fluorophores, optical analysis, DNA analysis, biotesting.