JOURNAL OF APPLIED SPECTROSCOPY

MAY — JUNE 2017

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КАРБОКСИФЛУОРЕСЦЕИНОВ В СОСТАВЕ КОВАЛЕНТНЫХ КОНЪЮГАТОВ С ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

В. А. Поведайло 1* , А. П. Ступак 1 , Д. А. Цыбульский 2 , В. В. Шманай 2 , Д. Л. Яковлев 1

УДК 535.372

(Поступила 30 января 2017)

С использованием уравнений Штерна—Фольмера выполнен анализ процессов динамического и статического тушения флуоресценции молекул 6-(2',7'-диметокси-4',5'-дихлор)карбоксифлуоресцеина (JOE) нуклеозидами дезоксиаденозином, дезоксицитидином, дезоксигуанозином, тимидином и дезоксиуридином в растворе трис-ацетатного буфера. Из пяти нуклеозидов лишь для дезоксигуанозина выявлен преимущественно статический механизм тушения флуоресценции. Показано, что квантовые выходы флуоресценции в растворе буфера для 5- и 6-карбоксифлуоресцениа (FAM), а также 5- и 6-JOE, ковалентно связанных жестким (4-транс-аминоциклогексанол) линкером с олигонуклеотидом, больше, чем в случае их аналогов с гибким (6-аминогексанол) линкером. Полученные данные свидетельствуют о том, что тушение флуоресценции в системах с гибким линкером осуществляется преимущественно вследствие ван-дер-ваальсова взаимодействия между флуорофором и гуанином. Увеличение количества последовательно расположенных гуанинов, связанных линкером с красителем в составе олигонуклеотидов и их дуплексов, приводит к снижению квантового выхода флуоресценции. На основании квантово-химических расчетов с использованием программы Gaussian 09 дана интерпретация смещения спектров поглощения и флуоресценции 5-FAM и 5-JOE в низкочастотную область относительно 6-изомеров.

Ключевые слова: дезоксирибоолигонуклеотид, ДНК-дуплекс, спектр поглощения, флуоресценция, квантовый выход, тушение флуоресценции, перенос электрона.

The dynamic and static quenching of 6-(2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro)carboxyfluorescein (JOE) by nucleosides (deoxyadenosine, deoxycytidine, deoxyguanosine, thymidine, and deoxycyridine) in the trisacetate buffer solution was analyzed using the Stern-Volmer equation. Only one of the five nucleosides – deoxyguanosine – was found to exhibit predominantly static quenching. The quantum yields of the fluorescence of 5- and 6-carboxyfluorescein (FAM), as well as of 5- and 6-JOE, covalently bound by a rigid (4-transaminocyclohexanol) linker to the oligonucleotide, is greater than for their analogues with flexible (6-aminohexanol) linker. It is shown that quenching of fluorescence in systems with a flexible linker takes place mainly with the van der Waals contact of the fluorophore with guanine. An increase in the number of consecutively located guanines at the 5'-end linked to the dye in the composition of oligonucleotides and their duplexes results in a decrease in the quantum yield of fluorescence. Quantum-chemical calculations show a shift of the absorption and fluorescence spectra of 5-FAM and 5-JOE isomers to the low-frequency region compared to 6-isomers

Keywords: deoxyribooligonucleotide, duplex, absorption spectra, fluorescence, quantum yield, quenching of fluorescence, electron transfer.

FLUORESCENCE QUENCHING OF CARBOXYFLUORESCEINS COVALENTLY CONJUGATED WITH OLIGONUCLEOTIDES

V. A. Povedailo ^{1*}, A. P. Stupak ¹, D. A. Tsybulsky ², V. V. Shmanai ², D. L. Yakovlev ¹ (¹B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, 68 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220072, Belarus; e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by; ²Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus)

¹ Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси,

^{220072,} Минск, просп. Независимости, 68, Беларусь; e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by

² Институт физико-органической химии НАН Беларуси, 220072, Минск, Беларусь

Введение. Интенсивность флуоресценции метки, ковалентно связанной с фрагментом ДНК, зависит от ряда факторов, к которым относятся расстояние между меткой и основанием нуклеотида, внутренняя структура линкера, а также само основание, находящееся рядом с меткой. Тушение флуоресценции некоторых красителей гуанином считается хорошо установленным фактом, механизм которого объясняется с помощью электронно-донорных свойств основания, т. е. невысоким окислительным потенциалом, в частности, гуанина [1—3]. В зависимости от восстановительного потенциала флуоресцентной метки может происходить эффективный внутримолекулярный перенос электрона с гуанина на фотовозбужденную метку при контакте с гуанином или при переносе электрона через линкер с последующим тушением фотовозбуждения. В качестве флуорофора при тушении гуанином подходят красители ряда родаминов, флуоресцеинов и оксазинов [3]. Экспериментальные доказательства тушения флуоресцеиновых красителей при фотовозбуждении за счет механизма переноса электрона от гуанина показаны на ряде примеров нестационарной абсорбционной субпикосекундной спектроскопии [4, 5].

Дополнительными исследованиями спектрально-люминесцентных свойств флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов установлено, что их оптические свойства зависят от различных параметров: качественного состава олигонуклеотида, наличия или отсутствия растворенного кислорода в образце, температуры раствора [6, 7]. Использование в качестве флуоресцентных красителей соединений флуоресценнового ряда приводит к появлению дополнительных параметров, таких как наличие изомерии и изменение структуры линкерной группы. Для модификации олигонуклеотидов красителями флуоресценнового ряда получают их функциональные производные, как правило, карбоксильные. Использование тримеллитового ангидрида вместо фталевого в синтезе карбоксильных производных ксантеновых красителей приводит к получению смеси двух изомеров [8, 9], в которых карбоксильная группа находится в 5- или 6-положении. Заметное влияние на флуоресцентные свойства красителя могут оказывать и свойства линкерной группы, связывающей краситель с олигонуклеотидной цепью.

Улучшение фотофизических характеристик флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов в результате оптимизации их структуры позволит расширить аналитические и диагностические возможности методов, в которых они используются. Несмотря на большое количество коммерчески доступных тест-систем, основанных на полимеразной цепной реакции с детектированием в режиме реального времени (ПЦР-РВ), и публикаций на эту тему (см., например, [10—13]), по-прежнему актуальны задачи повышения чувствительности анализа биологических проб с низкими концентрациями исследуемых материалов и разработка так называемых мультиплексных систем с функцией многоканального детектирования сигнала излучения одновременно от нескольких флуорофоров.

В данной работе исследуется влияние изомерии, структуры линкера и количества гуанинов на спектрально-люминесцентные свойства флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов.

Методика эксперимента. В качестве флуоресцентных красителей использованы изомеры 5-и 6-карбоксифлуоресцеина (FAM), 2',7'-диметокси-4',5'-дихлор-5(и 6)-карбоксифлуоресцеина (JOE). 6-Аминогексанол (Ah) и 4-*транс*-аминоциклогексанол (Ach) выбраны в качестве линкерных групп двух типов — гибкого и жесткого. Исследования спектрально-люминесцентных свойств флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов проведены на модельной последовательности из 16 нуклеиновых оснований. Олигонуклеотиды имели состав 5'-A- $(g)_n(a)_{16-n}$ -3', где A — флуоресцентный краситель, n — количество нуклеиновых оснований. Синтез и методика очистки олигонуклеотидов описаны в [14]. На рис. 1 схематически представлены дианионные формы изомеров 5- и 6-JOE, ковалентно связанных с олигонуклеотидом посредством гибкого и жесткого линкера (FAM связан с олигонуклеотидом аналогично).

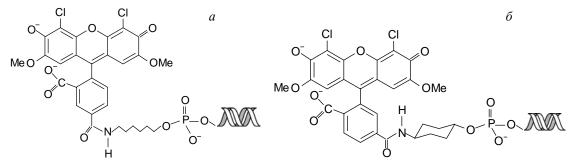


Рис. 1. Структуры изомеров 5- и 6-JOE, связанных с олигонуклеотидом гибким (a) и жестким (δ) линкерами (5- и 6-FAM связаны аналогично)

Спектры поглощения исследуемых соединений в растворе *трис*-ацетатного буфера с pH 8.8 зарегистрированы на спектрофотометре Varian Cary 500, спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции — на спектрометре Solar CM 2203. Раствор флуоресценна в 0.1 M NaOH использован в качестве стандарта сравнения квантового выхода FAM при возбуждении на длине волны 480 нм, раствор родамина 6G в этаноле — в качестве стандарта сравнения квантового выхода JOE при возбуждении на $\lambda = 515$ нм. Квантовый выход флуоресценции красителя рассчитан по формуле

$$\Phi = \Phi_{\text{ref}} \frac{I}{I_{\text{ref}}} \frac{D_{\text{ref}}}{D} \frac{n^2}{n_{\text{ref}}^2} ,$$

где $\Phi_{\rm ref}$ — квантовый выход стандарта сравнения; I, $I_{\rm ref}$ и D, $D_{\rm ref}$ — интегральные интенсивности и оптические плотности образца и стандарта сравнения; n и $n_{\rm ref}$ — показатели преломления растворителя образца и стандарта сравнения. Измерение кинетики люминесценции проведено методом время-коррелированного счета фотонов с использованием компьютерного модуля TCC900 (Edinburg Instruments). В качестве источника возбуждающих импульсов использован светоизлучающий диод PLS-8-2-130 (PicoQuant GmbH, Германия) ($\lambda_{\rm max}$ = 457 нм; FWHM ~ 713 пс). Дуплексы получены нагреванием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов в 20 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂ буфере (рН 8.8) с двукратным избытком комплементарных им олигонуклеотидов и медленным охлаждением в термостатируемой камере. Концентрация флуорофоров ~2.8 \cdot 10⁻⁶ М.

Результаты и их обсуждение. *Тушение флуоресценции*. Для интерпретации эффективности тушения флуоресцентных красителей основаниями нуклеотидов выполнен эксперимент по бимолекулярному диффузионно-столкновительному тушению флуоресценции молекул 6-JOE с дезоксиаденозином (dA), дезоксицитидином (dC), дезоксигуанозином (dG), тимидином (dT) и дезоксиуридином (dU). Детальный анализ механизма тушения довольно сложен, поэтому ограничимся исследованием уравнений Штерна—Фольмера с целью выяснения наличия динамического и/или статического тушения. Используем уравнение, связывающее отношение времени жизни τ_0/τ возбужденного состояния без тушителя и с тушителем с концентрацией тушителя $[\Theta]$:

$$\tau_0/\tau = 1 + K_{\text{dyn}}[\Theta] = 1 + k_{\text{q,dyn}}\tau_0[\Theta].$$
 (1)

Динамическая штерн-фольмеровская константа тушения $K_{\rm dyn}$ связана с динамической бимолекулярной константой скорости тушения соотношением $K_{\rm dyn} = k_{\rm q,dyn} \tau_0$.

Исследования проведены при возбуждении флуорофора излучением импульсного светодиода с $\lambda=457$ нм и регистрацией флуоресценции при $\lambda_{\varphi\pi}=560$ нм. Из пяти изученных дезоксинуклеозидов лишь одно соединение (dG) оказалось тушителем. Наблюдаются биэкспоненциальная кривая затухания флуоресценции для раствора 6-JOE с добавлением dG даже при небольших концентрациях $[\Theta]$ и моноэкспоненциальные зависимости для раствора 6-JOE без тушителя и при добавлении одного из нуклеозидов dA, dC, dT или dU. Быстрая компонента затухания соответствует первоначальному этапу и лежит в интервале 740—850 пс в зависимости от $[\Theta]$. Медленная компонента незначительно снижается с увеличением концентрации dG. Согласно [4], быстрая компонента соответствует комплексам бимолекулярного столкновения. На рис. 2 представлена измеренная зависимость τ_0/τ от концентрации тушителя $[\Theta]$. Время жизни возбужденного состояния 6-JOE без тушителя $\tau_0=4.35$ нс; значения τ , отражающие диффузионно-контролируемый процесс, определялись для длительной компоненты. По наклону полученной прямой определена динамическая бимолекулярная константа скорости тушения флуоресценции: $k_{\rm q,dyn}=(2.31\pm0.02)\cdot10^9\,{\rm M}^{-1}\cdot{\rm c}^{-1}, K_{\rm dyn}=10.05\pm0.09\,{\rm M}^{-1}$.

Наблюдаемая в координатах Штерна—Фольмера линейная зависимость τ_0/τ от $[\Theta]$ еще не доказывает, что происходит чисто динамическое тушение флуоресценции. Тушение может быть смешанным (динамическим и статическим) и дополнительно происходить в результате образования нефлуоресцирующих комплексов в основном состоянии между флуорофором и тушителем. Статическое тушение определяли по измерению квантовых выходов флуоресценции Φ_0 и Φ 6-JOE без тушителя и с тушителем. Спектры флуоресценции раствора 6-JOE при различных концентрациях дезоксинуклеозидов dA, dC, dT, dG и dU зарегистрированы при стационарном возбуждении ($\lambda_{воз6}$ = 460 нм). Исследования показывают, что интенсивность флуоресценции снижается лишь при добавлении dG. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции 6-JOE при добавлении тушителя в раствор смещаются в низкочастотную область. При $[\Theta]$ = 25 мМ (насыщенном растворе при 25 °C) смещение \sim 3 нм сопровождается небольшим ростом оптической плотности в максимуме первой полосы поглощения. Эти результаты также подтверждают наличие комплексов 6-JOE и dG в основном состоянии.

Результаты измерений в координатах Штерна—Фольмера представлены на рис. 2. Несовпадение зависимостей τ_0/τ и Φ_0/Φ от $[\Theta]$ указывает на проявление смешанного тушения. В таком случае статическая штерн-фольмеровская константа тушения K_s определяется из соотношения

$$\Phi_0/\Phi = (1 + K_{\text{dvn}}[\Theta])(1 + K_{\text{s}}[\Theta]). \tag{2}$$

Аппроксимация экспериментальных данных квадратичной зависимостью (2) дает $K_s = 62.42 \pm 1.18 \,\mathrm{M}^{-1}$ и статическую бимолекулярную константу скорости тушения $k_{q,s} = K_s/\tau_0 = (14.35 \pm 0.27) \cdot 10^9 \,\mathrm{M}^{-1} \cdot \mathrm{c}^{-1}$.

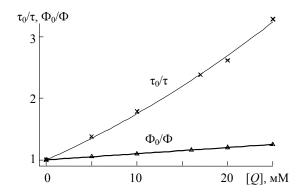


Рис. 2. Зависимости динамического (τ_0/τ) и статического (Φ_0/Φ) тушения 6-JOE от концентрации dG: точки — эксперимент, линии — аппроксимация

Сравним экспериментальное значение $k_{q,dyn}$ с рассчитанной из уравнения Смолуховского диффузионно-контролируемой бимолекулярной константой скорости k_0 :

$$k_0 = (4\pi N/1000)RD,$$
 (3)

где R — радиус столкновения; который обычно принимается равным сумме молекулярных радиусов флуоресцирующего красителя $(R_{\rm f})$ и тушителя $(R_{\rm q})$; D — сумма коэффициентов диффузии этих соединений $(D_{\rm f})$ и тушителя $(D_{\rm q})$; N — число Авогадро. Принималось $D_{\rm f} = 2.8 \cdot 10^{-6}$ см²/с, как и для раствора родамина 6G в воде [15], $D_{\rm q} = 3.93 \cdot 10^{-6}$ см²/с, как для 5'-гуанозинмонофосфата [16], и $R = 0.9 \cdot 10^{-7}$ см исходя из расчетов структуры молекул. Подставляя приведенные значения в уравнение (3), получаем $k_0 = 4.57 \cdot 10^9 \, {\rm M}^{-1} \cdot {\rm c}^{-1}$. Из этого следует, что динамическое тушение эффективно при каждом втором бимолекулярном столкновении молекулы 6-ЈОЕ с dG. Исследование тушения флуоресценции FAM нуклеиновыми основаниями в работе [3] показало, что лишь гуанин служит тушителем флуоресценции.

Спектры поглощения и флуоресценции меченых олигонуклеотидов. На рис. 3 представлены нормированные спектры поглощения и флуоресценции растворов олигонуклеотидов, меченных 5-и 6-FAM, а также 5- и 6-JOE с n=2,3,4,6,8,10. Характерная особенность спектров поглощения в растворе — их сдвиг на \sim 5—6 нм в низкочастотную область по отношению к несвязанным FAM и JOE и уширение с ростом n, причем увеличение полуширины спектров поглощения сопровождается уменьшением полуширины спектров возбуждения флуоресценции.

Спектры флуоресценции красителей слабо зависят от качественного состава олигонуклеотидов и строения линкерной группы для одного вида изомера. Как видно из рис. 3, спектры поглощения и флуоресценции 5-изомеров обоих соединений смещены в низкочастотную область по отношению к спектрам 6-изомеров. Для объяснения сдвига проведены квантово-химические расчеты с использованием программы Gaussian 09. Рентгеноструктурный анализ поликристаллической формы флуоресцеина показывает наличие двух взаимно перпендикулярных π -систем сопряжения, которые не зависят друг от друга из-за их слабого взаимодействия [17]. С учетом этого выполнен расчет зарядов π -систем сопряжения анионных форм ксантенового и фталевого фрагментов обоих соединений в воде. Результаты расчета полуэмпирическим (РМ3, РМ6) и DFT методами приведены в табл. 1. Как видно, для обоих соединений ксантеновый фрагмент π -системы сопряжения несет суммарный отрицательный заряд. Фталевый фрагмент 6-изомера имеет больший заряд π -системы сопряжения по сравнению с 5-изомером.

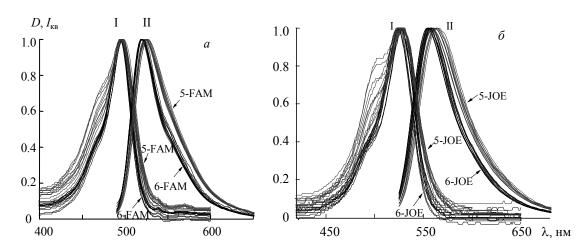


Рис. 3. Нормированные спектры поглощения (I) и флуоресценции (II) олигонуклеотидов, меченных FAM (a) и JOE (δ), спектры уширяются с увеличением n

Таблица 1. Суммарный заряд электронной плотности π -системы сопряжения ксантеновых и фталевых фрагментов молекул JOE и FAM с учетом влияния воды (РСМ модель, в единицах электрона по Малликену)

Фрагмент	Полуэмпири	ический метод	DFT		
	PM3	PM6	B3LYP/3-21g	B3LYP/6-31g	
Фталевый 6-изомера	-0.715	-0.754	-0.716	-0.384	
Фталевый 5-изомера	-0.712	-0.741	-0.707	-0.378	
Ксантеновый FAM	-1.164	-1.248	-1.344	-0.882	
Ксантеновый ЈОЕ	-0.384	-0.865	-0.298	-0.120	

Взаимодействие отрицательных зарядов двух систем сопряжения молекулы приводит к увеличению разности энергий НОМО-LUMO орбиталей ксантенового флуорофора и высокочастотному смещению спектров. Для 6-изомера обоих соединений это смещение больше, чем для 5-изомера, поэтому спектры поглощения и флуоресценции 5-изомера смещены в низкочастотную область по отношению к спектрам 6-изомера.

Квантовые выходы меченых олигонуклеотидов и их дуплексов. На рис. 4 представлены зависимости квантовых выходов флуоресценции растворов олигонуклеотидов, меченных 5- и 6-изомерами молекул FAM и JOE, от количества гуанина n и типа линкера. Изучены два вида линкеров с шестью метиленовыми группами с линейной (Ah) и циклической (Ach) структурами. Для жесткого линкера исключается возможность диффузионного бимолекулярного столкновения флуоресцентного красителя с гуанином, и в упрощенном представлении перенос электрона от гуанина к флуорофору можно представить как движение электрона от НОМО-орбитали гуанина к S_1 -состоянию фотовозбужденного флуорофора через LUMO-состояние линкера.

В случае гибкого линкера допускается возможность переноса электрона как по цепи, так и в результате образования столкновительного комплекса. Гибкий линкер затрудняет проведение исследования, так как в нем одновременно изменяются несколько параметров, особенно расстояние между флуорофором и тушителем. Показано [18, 19], что перенос электрона между донором и акцептором наиболее эффективен при трех метиленовых группах. Это обеспечивает образование стэкингструктуры, хотя перенос происходит с меньшей вероятностью и у линкера с двумя метиленовыми группами. Величина барьера вращения вокруг С-С-связи в алканах 3—4 ккал/моль [20], значит, все СН₂-группы линкера при комнатной температуре имеют торсионные движения. Однако их многократность приводит к сложной картине потенциальной поверхности с множеством барьеров и экстремумов, поэтому экспериментальные данные отражают сведения, средние по ансамблю цепи. Рассчитанные длины цепи жесткого и гибкого линкеров составляют ~5 и 9 Å. Ввиду наличия одинаковых групп (СН₂), входящих в состав линкера, с увеличением его длины скорость переноса электрона снижается [21, 22]. Анализ рис. 4 показывает, что квантовые выходы флуоресценции красителей, ко-

валентно связанных с олигонуклеотидами жестким линкером, имеют большее значение по сравнению с гибким, а следовательно, константы скорости переноса электрона исследуемых систем с гибким линкером выше, чем с жестким. Полученный результат свидетельствует о том, что в системах с гибким линкером тушение флуоресценции осуществляется преимущественно при ван-дер-ваальсовом контакте флуорофора с гуанином.

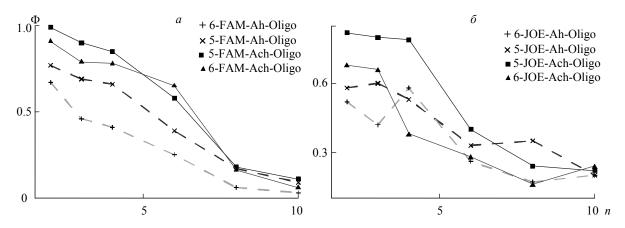


Рис. 4. Зависимость квантовых выходов флуоресценции олигонуклеотидов, меченных 5- и 6-изомерами FAM (a) и JOE (δ) с гибким (Ah) и жестким (Ach) линкерами, от количества оснований гуанина n

Квантовый выход флуоресценции меченых олигонуклеотидов в отсутствие тушения за счет переноса электрона с донора на акцептор можно рассчитать по формуле:

$$\Phi_0 = k_{\rm f}/(k_{\rm f} + k_{\rm ic} + k_{\rm isc}) = k_{\rm f}\tau_0, \tag{4}$$

при наличии тушения

$$\Phi = k_{\rm f}/(k_{\rm f} + k_{\rm ic} + k_{\rm isc} + k_{\rm et}),\tag{5}$$

где $k_{\rm f}$ — константа скорости флуоресценции; $k_{\rm ic}$ и $k_{\rm isc}$ — константы скорости внутренней и интеркомбинационной конверсий; $k_{\rm et}$ — константа скорости тушения флуоресценции при переносе электрона. Допуская, что константы $k_{\rm f}$, $k_{\rm ic}$, $k_{\rm isc}$ не изменяются для одного типа изомера и линкера, из выражений (4) и (5) определяем

$$k_{\text{et}} = (1/\tau_0)(\Phi_0/\Phi - 1).$$
 (6)

Величина Φ_0 измерена для олигонуклеотида СССССССССТТТТТТ, меченного красителями 5-и 6-JOE с гибким и жестким линкерами. Квантовые выходы перечисленных систем и длительные компоненты времени жизни флуоресценции равны 0.87 и 4.70 нс, 0.86 и 4.60 нс, 0.89 и 4.60 нс, 0.83 и 4.51 нс соответственно. С использованием указанных значений и квантовых выходов (рис. 4, δ) определены константы скорости тушения флуоресценции $k_{\rm et}$ изомеров 5- и 6-JOE при переносе электрона с гуанина на фотовозбужденный флуорофор в зависимости от количества гуанинов. Как следует из табл. 2, с ростом n увеличивается $k_{\rm et}$.

Особый интерес представляет закономерное снижение квантовых выходов флуоресценции меченых олигонуклеотидов (рис. 4) с гибким и жестким линкерами с увеличением количества последовательно расположенных гуанинов в олигонуклеотидах. Такой ход зависимости подтверждается квантово-химическими расчетами [23—25], где показано, что для систем G, GG, GGG потенциал ионизации понижается с увеличением количества гуанинов в последовательности и \sim 70 % электронной плотности НОМО-орбитали системы 5'-GG-3' сконцентрировано на фрагменте 5'-G. Этот вывод хорошо согласуется с экспериментальными данными (рис. 4). Для обоих соединений, за небольшим исключением, с увеличением в последовательности количества гуанинов квантовый выход снижается, а $k_{\rm et}$ растет, что связано с ростом константы скорости переноса электрона от гуанина к флуорофору и последующим тушением фотовозбуждения. Следует отметить, что при наличии небольшого количества гуаниновых оснований возле красителя (рис. 4) наблюдается различие между двумя изомерами: 6-изомеры красителей обладают пониженным квантовым выходом флуоресценции по сравнению с 5-изомерами. При увеличении количества гуаниновых оснований такое различие уменьшается.

	• •				·		
n	D	Φ	$k_{\rm et}$, 10^{-9} c ⁻¹	n	D	Φ	$k_{\rm et}, 10^{-9} {\rm c}^{-1}$
	5-JOE-Ah	0.58	0.11		5-JOE-Ah	0.33	0.35
2	5-JOE-Ach	0.82	0.01		5-JOE-Ach	0.40	0.25
2	6-JOE-Ah	0.52	0.15	6	6-JOE-Ah	0.26	0.53
	6-JOE-Ach	0.68	0.05		6-JOE-Ach	0.28	0.43
	5-JOE-Ah	0.60	0.10		5-JOE-Ah	0.35	0.32
3	5-JOE-Ach	0.80	0.016	8	5-JOE-Ach	0.24	0.56
3	6-JOE-Ah	0.42	0.24		6-JOE-Ah	0.17	0.92
	6-JOE-Ach	0.66	0.06		6-JOE-Ach	0.16	0.93
	5-JOE-Ah	0.53	0.14		5-JOE-Ah	0.20	0.71

10

0.02

0.12

0.26

5-JOE-Ach

6-JOE-Ah

6-JOE-Ach

0.22

0.20

0.24

0.63

0.75

0.54

0.79

0.58

0.38

5-JOE-Ach

6-JOE-Ah

6-JOE-Ach

4

Таблица 2. Квантовые выходы флуоресценции (Φ), константы скорости тушения ($k_{\rm et}$) олигонуклеотидов, меченных 5- и 6-изомерами JOE с гибким (Ah) и жестким (Ach) линкерами, при различном количестве гуанина n

Поскольку флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды применяются в диагностических исследованиях, предполагающих их гибридизацию на матрице, определение квантовых выходов красителей в составе дуплексов также представляется значимым. На рис. 5 показаны квантовые выходы флуоресценции 5-, 6-FAM и 5-, 6-JOE в составе дуплексов. Как видно, квантовый выход флуоресценции красителя в составе дуплекса менее подвержен действию тушения гуанинами по сравнению с соответствующим олигонуклеотидом. В целом тенденция снижения Φ с увеличением n имеет место и в дуплексах. К особой точке следует отнести n=8, в которой наблюдается резкое снижение квантовых выходов соединений с последующим ростом при увеличении n. Экспериментальные результаты коррелируют с теоретическими расчетами [26], где показано постоянное снижение потенциала ионизации гуанина последовательности ($G \cdot C$), дуплексной цепи, рассчитанной для n от 1 до 6.

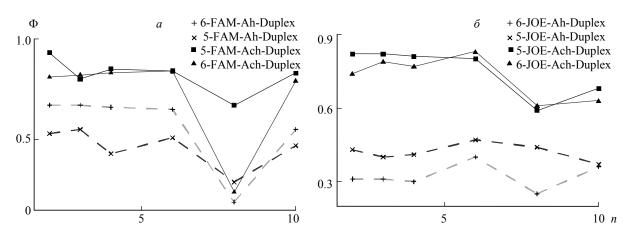


Рис. 5. Зависимость квантовых выходов флуоресценции (Φ) дуплексов, меченных 5- и 6- изомерами FAM (a) и JOE (δ) с гибким (Ah) и жестким (Ach) линкерами, от количества оснований гуанина n

Отметим, что в дуплексах наблюдается увеличение флуоресценции по сравнению с соответствующими им одноцепочечными олигонуклеотидами, флуоресценция которых заметно потушена (начиная с четырех гуанинов). Причем чем больше потушена флуоресценция в олигонуклеотиде, тем больше увеличивается флуоресценция при образовании дуплекса. Данный эффект представляется довольно интересным, поскольку может найти применение в некоторых методах, например ПЦР-РВ.

Затухание флуоресценции меченых олигонуклеотидов и дуплексов с гибким и жестким линкерами для обоих красителей би- или полиэкспоненциально. Биэкспоненциальность затухания с гибким линкером обусловлена проявлением различных конформационных форм 6-аминогексанола (гибкого линкера), что обеспечивает многообразие структур при комнатной температуре.

У молекулы циклогексана наряду с энергетически наиболее выгодной изомерной формой "кресло" имеются конформации "ванна" и "твист" [27]. Также возможны переходы "кресло"—"кресло" и других форм самих в себя с изменением углов связывания флуорофора и олигонуклеотида. Одновременное проявление различных изомеров в растворе обусловливает полиэкспоненциальность затухания флуоресценции обоих красителей и с жестким линкером.

Заключение. Выполнен эксперимент по бимолекулярному диффузионно-столкновительному тушению флуоресценции молекул 6-JOE с дезоксиаденозином (dA), дезоксицитидином (dC), дезоксигуанозином (dG), дезокситимидином (dT) и дезоксиуридином (dU) в *трис*-ацетатном буферном растворе с рН 8.8. Из пяти дезоксинуклеозидов только дезоксигуанозин тушит флуоресценцию 6-JOE; штерн-фольмеровские константы скорости тушения $K_{\rm dyn} = 10.05 \pm 0.09~{\rm M}^{-1}$ и $K_{\rm s} = 62.42 \pm 1.18~{\rm M}^{-1}$. Измерены спектры поглощения и флуоресценции растворов олигонуклеотидов, меченных 5- и 6-FAM, а также 5- и 6-JOE. На основе квантово-химических расчетов объяснены причины смещения в низкочастотную область спектров поглощения и флуоресценции олигонуклеотидов, меченных 5-изомерами по сравнению с меченными 6-изомерами молекул FAM и JOE. Квантовые выходы флуоресценции красителей, ковалентно связанных с олигонуклеотидом жестким линкером, больше, чем в случае с гибким при почти двукратно меньшей длине жесткого линкера (5 и 9 Å). Полученный результат показывает, что в системах с гибким (6-аминогексанол) линкером тушение флуоресценции осуществляется преимущественно при ван-дер-ваальсовом контакте флуорофора с гуанином.

Наблюдается снижение квантовых выходов флуоресценции меченых олигонуклеотидов с гибким и жестким линкерами с увеличением количества последовательно расположенных гуанинов в олигонуклеотиде. Такой ход зависимости подтверждается квантово-химическими расчетами [23—25] и объясняется постоянным снижением потенциала ионизации у гуанина с увеличением последовательности G, GG, GGG в цепи. В случае дуплексов эффект снижения квантового выхода флуоресценции не такой выраженный по сравнению с одноцепочечными аналогами. Более сильное влияние на снижение квантового выхода флуоресценции в данном случае оказывает структура линкера, а не изомерия положения карбоксильной группы. Как для FAM, так и для JOE квантовый выход флуоресценции дуплексов с гибким линкером на 20—25 % меньше по сравнению с аналогами с жестким линкером. Затухание флуоресценции меченых олигонуклеотидов и дуплексов с гибким и жестким линкерами для обоих красителей носит би- или полиэкспоненциальный характер, что связано с многообразием конформационных структур при комнатной температуре.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф16-103).

- [1] S. Doose, H. Neuweiler, M. Sauer. Chem. Phys. Chem., 10 (2009) 1389—1398
- [2] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer. J. Phys. Chem., 100 (1996) 5541—5553
- [3] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, R. Kurane. Anal. Sci., 17 (2001) 155—160
- [4] X Li, R Zhu, A. Yu, X. S. Zhao. J. Phys. Chem., B115 (2011) 6265—6271
- [5] R. Zhu, X. Li, X. S. Zhao, A. Yu. J. Phys. Chem., B115 (2011) 5001—5007
- [6] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton. J. Am. Chem. Soc., 119 (1997) 9861—9870
- [7] A. O. Crockett, C. T. Wittwer. Anal. Biochem., 290 (2001) 89—97
- [8] Y. Ueno, G.-S. Jiao, K. Burgess. Synthesis, 15 (2004) 2591—2593
- [9] M. H. Lyttle, T. G. Carter, R. M. Cook. Org. Proc. Res. Dev., 5 (2001) 45—49
- [10] M. Kubista, J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg, N. Zoric. Mol. Aspects Med., 27 (2006) 95—125
- [11] **B. Nagy.** J. Pediatr. Genet., **2** (2013) 1—8
- [12] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. J. Castaño, J. Solera. Clin. Chim. Acta, 439 (2015) 231—250
- [13] N. T. Salihah, M. M. Hossain, H. Lubis, M. U. Ahmed. J. Food Sci. Technol., 53 (2016) 2196—2209
- [14] M. V. Kvach, I. A. Stepanova, I. A. Prokhorenko, A. P. Stupak, D. A. Bolibrukh, V. A. Korshun, V. V. Shmanai. Bioconjugate Chem., **20** (2009) 1673—1682
- [15] S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare. Science, 266 (1994) 1018—1021
- [16] H. Jurga-Nowak, E. Banachowicz, A. Dobek, A. Patkowski. J. Phys. Chem., B108 (2004) 2744—2750
- [17] M. Tremayne, B. M. Kariuki, K. D. M. Harris. Angew. Chem. Int. Ed., 36 (1997) 770—772
- [18] N. Mataga, H. Misuhara, N. Nakashima, Y. Sakata, S. Misumi, J. Lumin., 12/13 (1976) 159—168

- [19] T. Okada, M. Migita, N Mataga, Y. Sakata, S. Misumi. J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 4715—4720
- [20] Y. Mo. WIREs Comp. Mol. Sci., 1 (2011) 164—171
- [21] K. Pettersson, J. Wiberg, T. Ljungdahl, J. Mårtensson, B. Albinsson. J. Phys. Chem., A110 (2006) 319—326
- [22] **T. Hines, I. Diez-Perez, J. Hihath, H. Liu, Z. Wang, J. Zhao, G. Zhou, K. Mullen, N. Tao.** J. Am. Chem. Soc., **132** (2010) 11658—11664
- [23] H. Sugiyama, I. Saito. J. Am. Chem. Soc., 118 (1996) 7063—7068
- [24] F. Prat, K. N. Houk, C. S. Foote. J. Am. Chem. Soc., 120 (1998) 845—846
- [25] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski. J. Am. Chem. Soc., 122 (2000) 12037—12038
- [26] S. Yokojima, N. Yoshiki, W. Yonai, A. Okada. J. Phys. Chem., B113 (2009) 16384—16392
- [27] G. Gill, D. M. Pawar, E. A. Noe. J. Org. Chem., 70 (2005) 10726—10731