

СИНТЕЗ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ КОНЬЮГАЦИИ С БИОМОЛЕКУЛАМИ

А. А. Кмит

Белорусский государственный университет, Минск;

che.kmit@bsu.by;

науч. рук. – В. В. Шманай, канд. хим. наук, доц.

На основе двух последовательных реакций азосочетания синтезирован тушитель флуоресценции ВВQ-ОН для дальнейшего конъюгирования с биомолекулами с целью внедрения в олигонуклеотидные гибридизационные зонды, использующиеся в анализе методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Ключевые слова: азокрасители; тушение флуоресценции; полимеразная цепная реакция; гибридизационные зонды; биоконъюгация.

ВВЕДЕНИЕ

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени – один из наиболее популярных методов лабораторной диагностики в настоящее время [1]. Детекцию результатов в данном методе анализа часто осуществляют с использованием гибридизационных зондов – олигонуклеотидов, меченных в разных сочетаниях одним или несколькими флуоресцентными красителями и тушителями флуоресценции по концам и/или внутри цепочки, которые функционируют по отдельности или в паре, обеспечивают «включение-выключение» флуоресценции и дают изменение интенсивности флуоресцентного сигнала за счет процессов внутри- и межмолекулярного переноса энергии при образовании вторичных структур [2].

Спектр используемых на практике флуоресцентных красителей широк. Подбираемые к ним в пару тушители флуоресценции должны удовлетворять ряду требований, таких как высокая стабильность, стойкость к обесцвечиванию, наличие широких спектров поглощения и инертность по отношению к биологическим системам. В связи с этим поиск и синтез новых универсальных тушителей остается актуальной задачей.

В течение последних десятилетий нефлуоресцентные азокрасители хорошо зарекомендовали себя в использовании в качестве тушителей флуоресценции [3]. Имея протяженную систему сопряжения, они демонстрируют широкие спектры поглощения в видимой и близкой к инфракрасной областям, вследствие чего могут работать в паре со многими известными флуоресцентными красителями. Одним из таких азокрасителей является тушитель ВВQ-650 (BlackBerry Quencher). Он устойчив по отношению к реагентам, использующимся для синтеза олигонуклеотидных цепочек, а

также подходит для создания гибридных зондов любой длины. Его спектр поглощения лежит в области от 550 до 750 нм. В патенте [4] метод синтеза тушителей типа ВВQ не представлен. Предлагаемый в статье [5] метод синтеза модифицированного тушителя ВВQ-ОН не имеет точного и воспроизводимого описания. Таким образом, на данный момент, фиксированные методы получения тушителя, чья практическая ценность заключается в его универсальности, отсутствуют. В связи с этим нами был разработан метод синтеза тушителя ВВQ-ОН, основанный на двух последовательных реакциях азосочетания.

Как показано на схеме, пара-нитроанилин (**1**) подвергается диазотированию. Полученная соль диазония (**2**) азосочетается с анилином (**3**). При этом образуется краситель (**4**), который, в свою очередь, подвергается диазотированию и азосочетанию с 8-гидроксиололидином (**6**), давая искомым базовый хромофор ВВQ-ОН (**7**). Содержащаяся в нём гидроксогруппа в дальнейшем будет использована для конъюгации с биомолекулами.

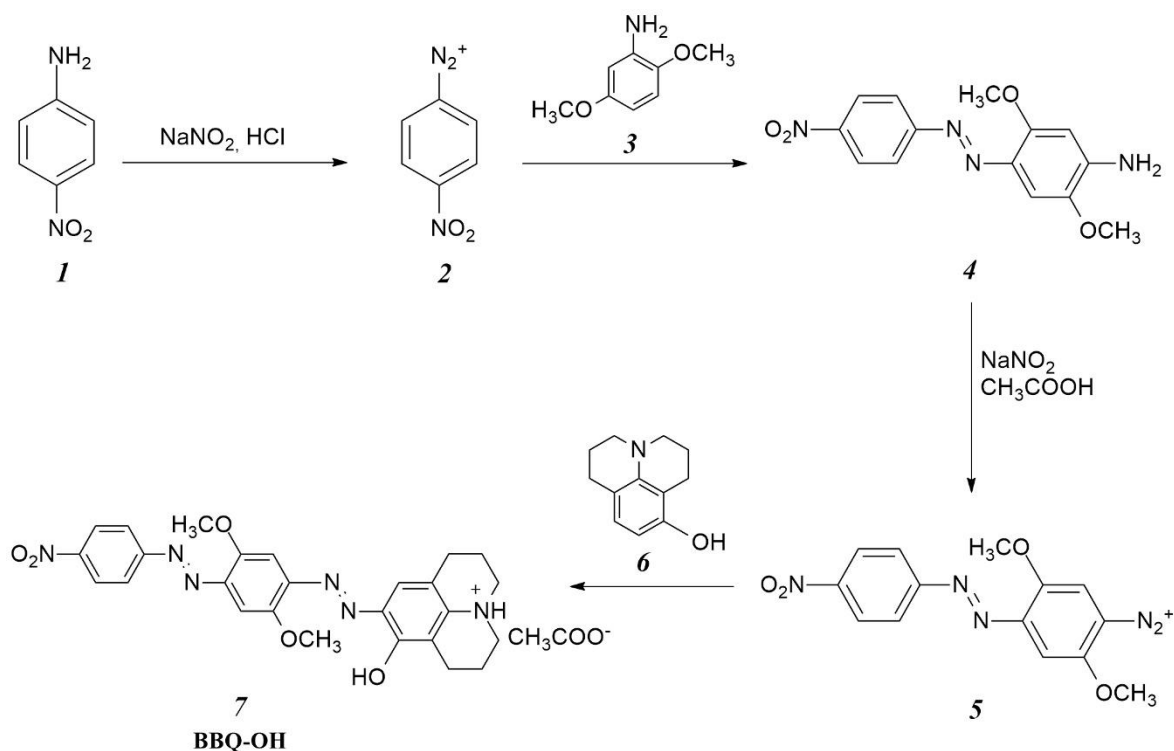


Схема 1. Метод синтеза тушителя ВВQ-ОН

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2,5-диметокси-4-(4-нитрофенилазо)анилин (4). К раствору п-нитроанилина (**1**, 60 г, 435 ммоль) в смеси 600 мл холодной воды и 250 мл

HCl (конц) добавили раствор NaNO₂ (30 г, 435 ммоль) в 200 мл воды по каплям при 5 °С. Смесь перемешивали 30 минут, после чего внесли 4 г сульфаниловой кислоты. Перемешивали в течение 20 минут. Полученный раствор соли диазония (**2**) прикапывали к раствору 2,5-диметоксианилина (**3**, 66,5 г, 435 ммоль) в 560 мл воды, 80 мл HCl_{конц}, 160 мл этилового спирта. Перемешивали сутки. Выпавший осадок фильтровали, промыли горячей водой, сушили. Перекристаллизовывали из этилового спирта. Выход 127 г (97%), кирпично-красный порошок, T_{пл} > 250 °С.

9-((2,5-диметокси-4-((4-нитрофенил)дiazенил)фенил)дiazенил)-2,3,6,7-тетрагидро-1H,5H-пиридо-[3,2,1-ij]хинолин-8-ол ацетат (7). К раствору 2,5-диметокси-4-(4-нитрофенилазо)анилина (**4**, 1 г, 3,3 ммоль) в 20 мл уксусной кислоты при перемешивании добавляли порциями NaNO₂ (0,228 г, 3,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 20 минут, после чего внесли 0,63 г 8-гидроксоюлолидина (**6**, 3,3 ммоль). Через 2 часа полученную суспензию медленно вливали в 500 мл холодной воды при перемешивании. Выпавший осадок фильтровали. Сушили на воздухе. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: дихлорметан; градиент: метанол, 0,5-5,5%). Выход 0,663 г (40%), черный порошок, T_{пл} > 250 °С, R_f 0,74 (Py-MeOH-CH₂Cl₂, 1:5:100).

Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 1,64 (3H, с, CH₃); 1,94 (4H, м, CH₂); 2,66 (4H, т, CH₂); 3,26 (4H, м, CH₂); 4,00 (3H, с, OCH₃); 4,1 (3H, с, OCH₃); 6,69 (1H, уш. с, H Ar); 7,35 (2H, д, H Ar); 7,43 (1H, с, H Ar); 7,47 (1H, с, H Ar); 7,90 (2H, д, H Ar); 8,31 (2H, д, H Ar); 16,75 (1H, с, H⁺). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 22,1; 22,4; 22,8; 27,6; 51,7; 55,8; 110,3; 110,7; 114,8; 115,2; 120,9; 123,2; 124,2; 126,7; 145,8; 148,2; 150,1; 155,5.

Библиографические ссылки

1. *Seifi M.* Overview of real-time PCR principles // Polymerase chain reaction (Chapter 19): InTech, 2012. 566 p.
2. *Бикбулатова С. М.* Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестник Башкирского университета. 2012. Т. 17. №1. с. 59–67.
3. *Chevalier A.* Azo-Based Fluorogenic Probes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Upcoming Challenges // Chem. Asian J. 2017. Vol. 12. I. 16. P. 2008-2028.
4. Пат. 7879986 США, C09B 31/153, C07H 19/04, C12Q 1/68. Dark quenchers, probes and other conjugates incorporating the same, and their use. / D. A. Berry, W. H. Pearson; Berry & Associates, Inc. № 11/346688; Заявлено 03.02.2006; Опубл. 01.02.2011. 19 с.
5. *Chevalier, A.* Straightforward synthesis of bioconjugatable azo dyes. Part 2: Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) and BlackBerry Quencher 650 (BBQ-650) scaffolds // Tetrahedron Lett. 2014. Vol. 55. I. 50. P. 6764-6768