

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННЫХ С 5'-ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

В.А. Поведайло¹, Д.А. Цыбульский², В.В. Шманай², Д.Л. Яковлев¹

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

²Институт Физико-Органической химии НАН Беларуси, Минск

E-mail: poved@ifanbel.bas-net.by

Тушение флуоресценции некоторых красителей гуанином считается хорошо установленным фактом, механизм которого объясняется с помощью электронно-донорных свойств основания. В зависимости от восстановительного потенциала флуоресцентной метки может происходить эффективный внутримолекулярный перенос электрона с гуанина на фотовозбужденную метку с последующим гашением фотовозбуждения.

Интенсивность флуоресценции метки, ковалентно связанной с фрагментом ДНК, зависит от ряда факторов. В данной работе исследуется влияние изомерии красителя, структуры линкера и количества молекул гуанина на спектрально-люминесцентные свойства флуоресцентно меченых олигонуклеотидов.

В качестве флуоресцентных красителей были использованы изомеры 5- и 6-карбоксифлуоресцеина (*FAM*), 2',7'-диметокси-4',5'-дихлор-5(и 6)-карбо-ксифлуоресцеина (*JOE*). 6-Амино-гексанол (*Ah*) и 4-транс-амино-циклогексанол (*Ach*) выбраны в качестве линкеров двух типов – гибкого и жесткого, соответственно. Исследования спектрально-люминесцентных свойств флуоресцентно меченых олигонуклеотидов проводились на модельной последовательности из 16 нуклеиновых оснований. Олигонуклеотиды имели состав 5'-A-(g)_n(a)_{16-n}-3', где A –краситель, n – количество нуклеиновых оснований.

Выполнен эксперимент по бимолекулярному диффузионно-столкновительному тушению флуоресценции молекул 6-*JOE* с дезоксиаденозином (*dA*), дезоксицитидином (*dC*), дезоксигуанозином (*dG*), тимидином (*dT*) и дезоксиуридином (*dU*). Анализ механизма тушения проведен с использованием уравнений Штерна-Фольмера. Из пяти изученных на предмет тушения дезоксинуклеозидов лишь одно соединение (*dG*) оказалось тушителем. Наблюдалась биэкспоненциальная кривая затухания флуоресценции для раствора 6-*JOE* с добавлением *dG* и моноэкспоненциальные зависимости для раствора 6-*JOE* без тушителя и при добавлении одного из дезоксинуклеозидов *dA*, *dC*, *dT* или *dU*. Результаты измерений зависимостей отношения τ_0/τ времён жизни возбужденного со-

стояния без тушителя (τ_0) и при его наличии (τ) и соответствующих квантовых выходов Φ_0/Φ от концентрации $[\Theta]$ указывают на проявление смешанного динамического и статического тушения. Динамическая константа скорости тушения флуоресценции $K_{dyn} = 10.05 \pm 0.09 \text{ M}^{-1}$, статическая $K_s = 62.42 \pm 1.18 \text{ M}^{-1}$.

Зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции растворов олигонуклеотидов, меченых 5- и 6-FAM, а также 5- и 6-JOE со значением n , равным 2, 3, 4, 6, 8 и 10. Спектры поглощения и флуоресценции 5-изомера обоих соединений смещены в низкочастотную область по отношению к спектрам 6-изомера. Для объяснения сдвига проведены квантово-химические расчеты с использованием программы *Gaussian 09*. Результаты расчета показывают, что для обоих соединений ксантовый фрагмент π -системы сопряжения несет суммарный отрицательный заряд. Фталевый фрагмент 6-го изомера имеет бóльшую величину заряда π -системы сопряжения по сравнению с 5-м изомером. Взаимодействие отрицательных зарядов двух систем сопряжения молекулы приводит к увеличению разности энергий *HOMO-LUMO* орбиталей ксантового фрагмента флуорофора. Для 6-изомера эта величина смещения обоих соединений больше, нежели у 5-го, поэтому спектры поглощения и флуоресценции 5-го изомера смещены в низкочастотную область по отношению к спектрам 6-го изомера.

Наблюдается закономерное снижение квантовых выходов флуоресценции меченых олигонуклеотидов с гибким и жестким линкерами с увеличением количества последовательно расположенных гуанинов в олигонуклеотидах. Такой ход зависимости подтверждается квантово-химическими расчетами работы [1], в которой показано, что для систем G, GG, GGG потенциал ионизации понижается с увеличением количества гуанинов в последовательности.

Дополнительный анализ данных показывает, что квантовые выходы флуоресценции красителей, ковалентно связанных с олигонуклеотидами жестким линкером, имеют большее значение по сравнению с гибким, а константы скорости переноса электрона, соответственно, ниже. Полученный результат свидетельствует о том, что в системах с гибким линкером тушение флуоресценции осуществляется преимущественно при вандер-ваальсовом контакте флуорофора с гуанином.

1. Yokojima S., Yoshiki N., Yonai W., Okada A.// J. Phys. Chem. 2009, B113. P. 16384–16392.