



УДК 577.113.6:547.963.32'979.057

© 1993 А. А. Кошкин, Т. М. Иванова,
Н. В. Булычев, М. И. Добриков, А. В. Лебедев

ФОТОАКТИВНЫЕ ЭТИДИЕВЫЕ И АЗИДОЭТИДИЕВЫЕ КРАСИТЕЛИ.
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И КОВАЛЕНТНОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ
К ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Разработаны методы синтеза производных этидиевых и азидоэтидиевых красителей, содержащих свободную алифатическую аминогруппу остатка 3-аминопропионовой кислоты. Производные охарактеризованы спектральными методами (ЯМР-, УФ- и флуоресцентная спектроскопия). Методом флуоресцентного титрования исследовано комплексообразование синтезированных этидиевых красителей с ДНК. Показано, что стехиометрия комплексов для всех красителей составляет 1 : 4 (в расчете на пару оснований НК). Установлено, что фотоактивность азидоэтидиевых красителей в 10^3 раз выше, а квантовый выход продуктов фотопревращения в 10^5 раз выше, чем для этидиевых красителей. На примере синтеза этидиевого производного гептадезоксинуклеотида pd(CSAAACA) разработана методика получения 5'-фосфамидных фотоактивных олигонуклеотидных производных.

Бромистый этидий (EtdBr) благодаря своей способности образовывать прочные нековалентные комплексы с нуклеиновыми кислотами (НК), обнаруженной около 30 лет назад [1], широко применяется в качестве модельного соединения для изучения механизма взаимодействия НК с интеркалирующими красителями и для изучения вторичной структуры НК [2—5]. Большинство используемых для этой цели методов основано на исследовании изменения спектральных характеристик EtdBr при образовании комплексов с НК и/или на его способности модифицировать (разрезать) НК при облучении светом большой интенсивности [6].

Существенным недостатком EtdBr является его относительно низкая фотохимическая активность и отсутствие выраженной селективности по отношению к последовательности оснований НК [7]. Введением в состав EtdBr ароматических азидогрупп можно значительно повысить его фотоактивность, а проблема селективности может быть решена, если использовать этидиевые красители, ковалентно присоединенные к олигонуклеотиду-адресу. Такие производные могут быть направлены в любой заранее выбранный участок нуклеиновой кислоты-мишени за счет образования комплементарных комплексов.

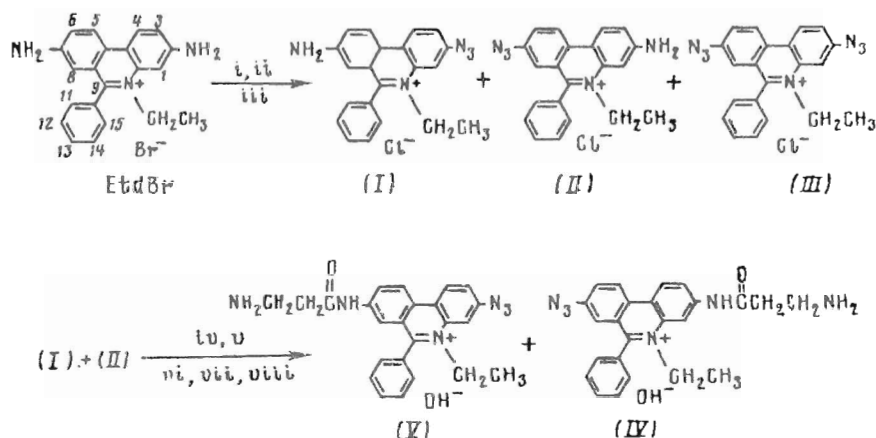
Впервые аналог этидиевого производного олигонуклеотида, содержащий ковалентно присоединенный к межнуклеотидному фосфату d(TrT) остаток метидия, описан в работе [8]. Позднее в работе [9] для фотомодификации олигонуклеотидов-мишеней были испытаны ковалентно присоединенные к концевому фосфату олигонуклеотида-адреса этидиевые красители, которые при интенсивном световом облучении приводили к специфической фотомодификации мишени. В последнее время этидиевые производные олигонуклеотидов успешно использовали для аф-

финной фотомодификации белков и биохимического исследования ферментативных систем (например, [10] и [11]).

Несмотря на перспективность использования этидиевых производных олигонуклеотидов, до сих пор не были описаны детали их синтеза, а также физико-химические характеристики и фотохимические свойства этидиевых красителей. В настоящей работе приведены результаты, восполняющие этот пробел.

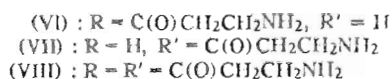
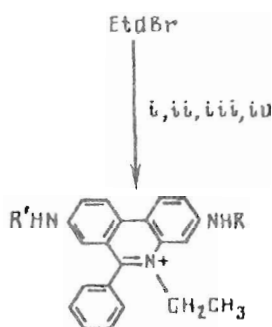
Введение азидогруппы в молекулу этидиевого красителя проводили согласно работе [12] с некоторой модификацией (см. схему 1 и «Экспер. часть»). В результате синтеза была получена смесь 2- и 7-моноазидов этидиевого красителя (I) и (II). Присоединение остатка 3-аминопропионой кислоты к ароматической аминогруппе моноазида (I) или (II) проводили обработкой их смеси хлорангидридом N-трифторацетил-3-аминопропионой кислоты. Трифторацетильные производные разделяли методом ВЭЖХ на силикагеле и выделяли индивидуальные моноазиды (IV) или (V) после удаления трифторацетильной защитной группы и последующей хроматографии.

Схема 1



- i : NaNO_2 (HCl, pH 3,0);
- ii : NaN_3 (HCl, pH 3,0);
- iii : хроматография на СМ-сефадексе;
- iv : хлорангидрид N-трифторацетил-3-аминопропионой кислоты;
- v : ВЭЖХ в системе 1А;
- vi : 7,5 М аммиак в метаноле;
- vii : ВЭЖХ в системе 1Б;
- viii : хроматография на СМ-сефадексе.

Для присоединения остатка 3-аминопропионой кислоты к EtdBr последний обрабатывали смесью трифторуксусного ангидрида и хлорангидрида N-трифторацетил-3-аминопропионой кислоты (схема 2). Ввиду наличия двух аминогрупп в молекуле EtdBr при этом образуется смесь продуктов, представляющих собой различные варианты присоединения остатков трифторацетила и N-трифторпропионила по каждой из них. Это позволило получить одновременно продукты как моно-, так и диацилирования ароматических аминогрупп. После удаления трифторацетильных защит как с ароматических, так и с алифатических аминогрупп продукты синтеза (VI) — (VIII) разделяли методом ВЭЖХ на силикагеле в системе 1Б. Окончательную очистку всех полученных соединений проводили методом ионообменной хроматографии для удаления трифторацетата аммония, остающегося в элюате после хроматографии на силикагеле.



i : хлоранидрид N-трифторангил-3-аминопропионой кислоты — трифторуксусный ангидрид (1 : 1, по объему);

ii : 7,5 M аммиак в метаноле;

iii : ВЭЖХ в системе 1Б;

iv : хроматография на СМ-соефадексе.

Данные ¹H-ЯМР-спектров соединений (IV) — (VII) и Et₄Br представлены в табл. 1. Отнесение сигналов проведено путем сравнения спектров полученных красителей и исходного Et₄Br, а также с использованием метода двойного резонанса {¹H}-¹H. В качестве критерия для определения положения остатка 3-аминопропионой кислоты и азидогруппы служило положение сигналов протонов H1, H3, H6 и H8. Присоединение остатка 3-аминопропионой кислоты

Таблица 1
 Значения химических сдвигов сигналов протонов (м.д.) и констант спин-спинового взаимодействия J (Гц) для бромистого этидия и соединений (IV) — (VII)

	Et ₄ Br	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)
H1	7,44	8,62	7,76	8,52	7,30	8,60
H3	7,30	7,72	7,59	7,67	7,22	7,75
H4	8,41	8,57	8,72	8,53	8,33	8,58
H5	8,44	8,50	8,61	8,42	8,30	8,49
H6	6,65	7,59	7,93	7,52	7,70	7,86
H8	6,97	6,81	7,70	6,65	7,50	7,68
H11, H15	7,35	7,38	7,41	7,36	7,32	7,35
H12, H14	7,60	7,60	7,61	7,59	7,60	7,62
H13	7,67	7,64	7,72	7,62	7,62	7,66
—C(O)C(=O)— (2) *	—	2,81	—	2,80	—	2,82
—C(O)C(=O)— (7) *	—	—	2,65	—	2,63	2,64
—CH ₂ N— (2) *	—	3,21	—	3,21	—	3,22
—C(=O)N— (7) *	—	—	3,08	—	3,07	3,08
—CH ₂ — (10) *	4,49	4,58	4,63	4,55	4,46	4,59
—CH ₃	1,26	1,35	1,32	1,32	1,26	1,34
J _{1,3}	2,0	1,8	1,8	1,8	2,0	1,8
J _{3,4}	9,0	9,2	8,8	9,2	9,2	9,2
J _{5,6}	9,2	8,8	9,2	9,0	9,2	9,2
J _{6,8}	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
J(CH ₂ —CH ₂)	—	6,7	6,6	6,7	6,7	6,6
J(CH ₂ —CH ₃)	7,2	7,1	7,2	7,2	7,2	7,2

* В скобках указано положение заместителя, содержащего метиленовую группу. Спектры записаны в D₂O (pD 6,5); концентрация 10 мМ; внутренний стандарт — DMSO.

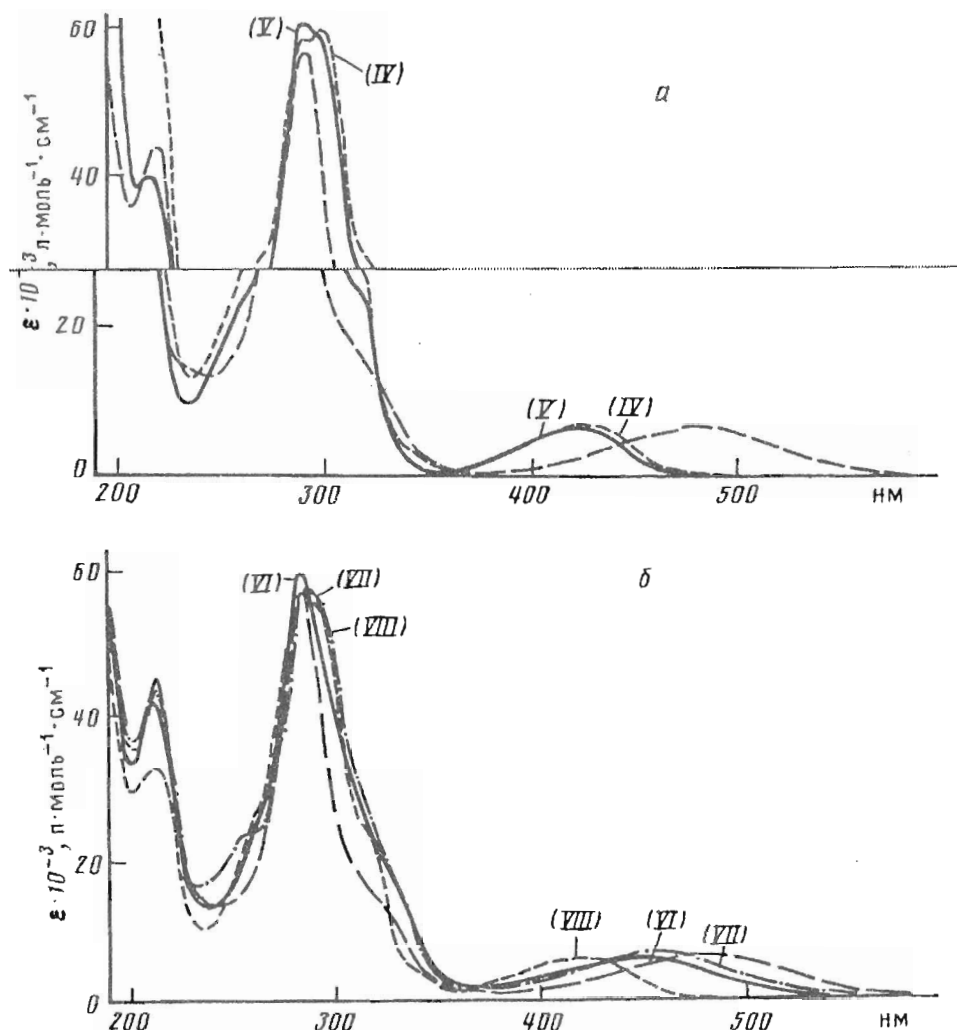
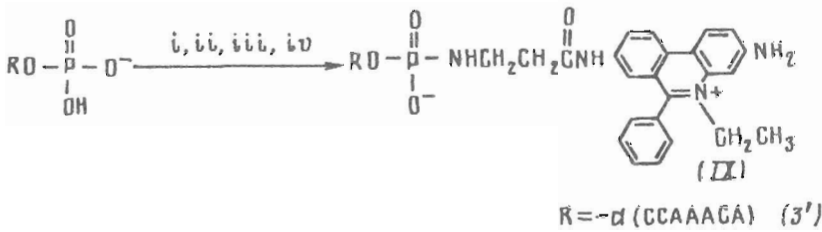


Рис. 1. Спектры поглощения соединений (IV), (V) (а), (VI) — (VIII) (б) и EtdBr (штриховая линия) в воде (рН 6,5); концентрация $1,93 \cdot 10^{-4}$ М

к экзоциклической аминогруппе этидия в положении 2 или 7 должно (согласно данным [13]) оказывать дезэкранирующее влияние на сигналы ближайших *орто*-протонов, т. е. Н1 и Н3 (заместитель в положении 2) или Н6 и Н8 (заместитель в положении 7). Поэтому сигналы Н8 в спектрах соединения (VI) и EtdBr регистрируются в области 6,6—7,0 м.д., а сигналы Н8 соединений (VII) и (VIII) — при 7,50 и 7,68 м.д. соответственно. С другой стороны, резонансы Н1 для соединений (VI) и (VIII) сдвинуты на 1,1—1,3 м.д. в область более слабого поля по сравнению с сигналами Н1 в случае соединения (VII) и EtdBr. Аналогичные утверждения справедливы и для сигналов Н3 и Н6, хотя дезэкранирующий эффект после присоединения остатка 3-аминопропионовой кислоты в этом случае менее значителен (~0,6 м.д.). Для азидопроизводных (IV) и (V) сохраняются аналогичные закономерности изменения химических сдвигов сигналов протонов Н1, Н3, Н6 и Н8 по сравнению со спектром EtdBr.

УФ-спектры синтезированных красителей (IV) — (VIII) представлены на рис. 1а, б. По сравнению со спектром EtdBr в спектрах его производных наблюдается гипсохромный сдвиг длинноволнового максимума поглощения, причем наи-

Схема 3



- i : трифенилфосфин; 2,2'-дипиридилдисульфид — DMSO;
 ii : N,N-диметиламинопиридин;
 iii : соединение (VII);
 iv : ВЭЖХ в системе 2.

большой сдвиг регистрируется в случае азидопроизводных (IV) и (V), а также производного (VIII). Для этих же производных характерно наличие трех полос поглощения в области 285, 300 и 320 нм, в то время как для производных (VI), (VII) и EtdBr обнаруживается только один явно выраженный максимум в области 280—290 нм. Спектры флуоресценции соединений (IV), (V) и (VIII) также значительно отличаются от спектров соединений (VI), (VII) и EtdBr (рис. 2). Видно смещение максимума (на 120—140 нм) и усиление интенсивности флуоресценции: для производных (IV) и (V) в 2—3 раза, а для производного (VIII) в 20 раз по сравнению с EtdBr. Интенсивность флуоресценции соединений (VI) и (VII) оказалась соответственно в 5 и 2 раза ниже, чем у EtdBr.

Известно, что EtdBr обладает повышенным сродством к ДНК, поэтому было целесообразно исследовать комплексобразующие свойства синтезированных этидиевых производных. В табл. 2 представлены результаты титрования красителей (VI) — (VIII) и EtdBr тимусной ДНК (эксперименты с азидоэтидиевыми производными не проводили в связи с их высокой фотоактивностью). Из данных таблицы видно, что поведение красителей различно. В то время как интенсивность флуоресценции соединений (VI), (VII) и EtdBr при увеличении концентрации ДНК возрастает в разной степени, флуоресценция соединения (VIII) падает. По кривым титрования были рассчитаны составы комплексов краситель—ДНК при полном насыщении ДНК по каждому из красителей. Во всех случаях молярное соотношение краситель—пара оснований ДНК оказалось близко к 1 : 4, как и для EtdBr.

Данные по фотоактивности этидиевых производных и их азидов приведены в табл. 3 (детали см. в «Экспер. части»). Фотоактивность азидопроизводных (IV) и (V) превышает фотоактивность соединений (VI) — (VIII) и EtdBr на 3—4 порядка при облучении светом 290—380 нм. Соединения (IV) и (V) оказались также более фотоактивны (особенно в длинноволновой (> 400 нм) области) по сравнению с предложенными ранее в работе [14] *n*-азидобензойной и *n*-азидотетрафторбензойной кислотами. Это позволяет рассматривать азидоэтидиевые производные как потенциально более перспективные фотореагенты для модификации биополимеров. Использование в качестве фотореагента моноазид (V) более предпочтительно по сравнению с моноазидом (IV), поскольку это соединение в УФ-диапазоне в 2 раза, а в видимой области в 12 раз превосходит по фотоактивности соединение (IV).

Методика получения этидиевых производных олигонуклеотидов была отработана на примере синтеза соединения (IX). Краситель присоединяли к 5'-концевому фосфату олигодезоксирибонуклеотида dp(CCAAACA) по схеме 3, через промежуточное образование 4-N,N-диметиламинопиридиниевого производного олигонуклеотида [15].

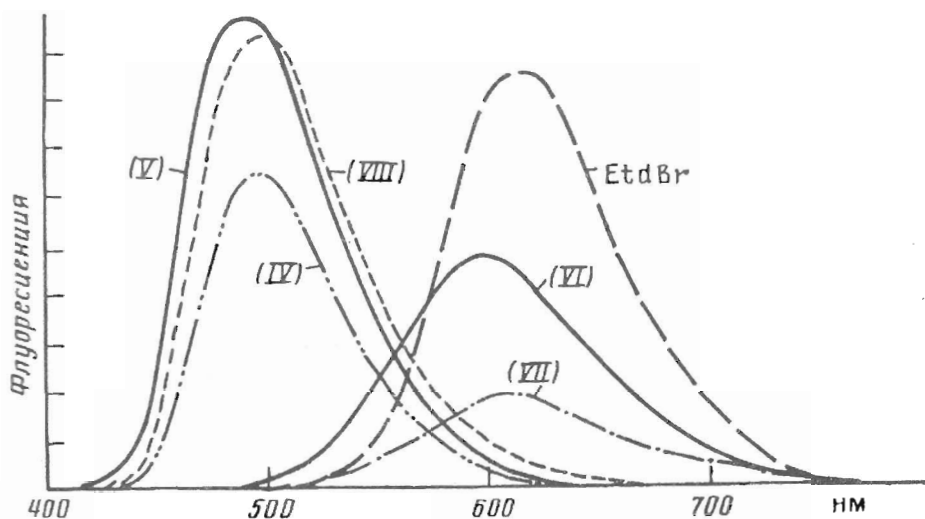
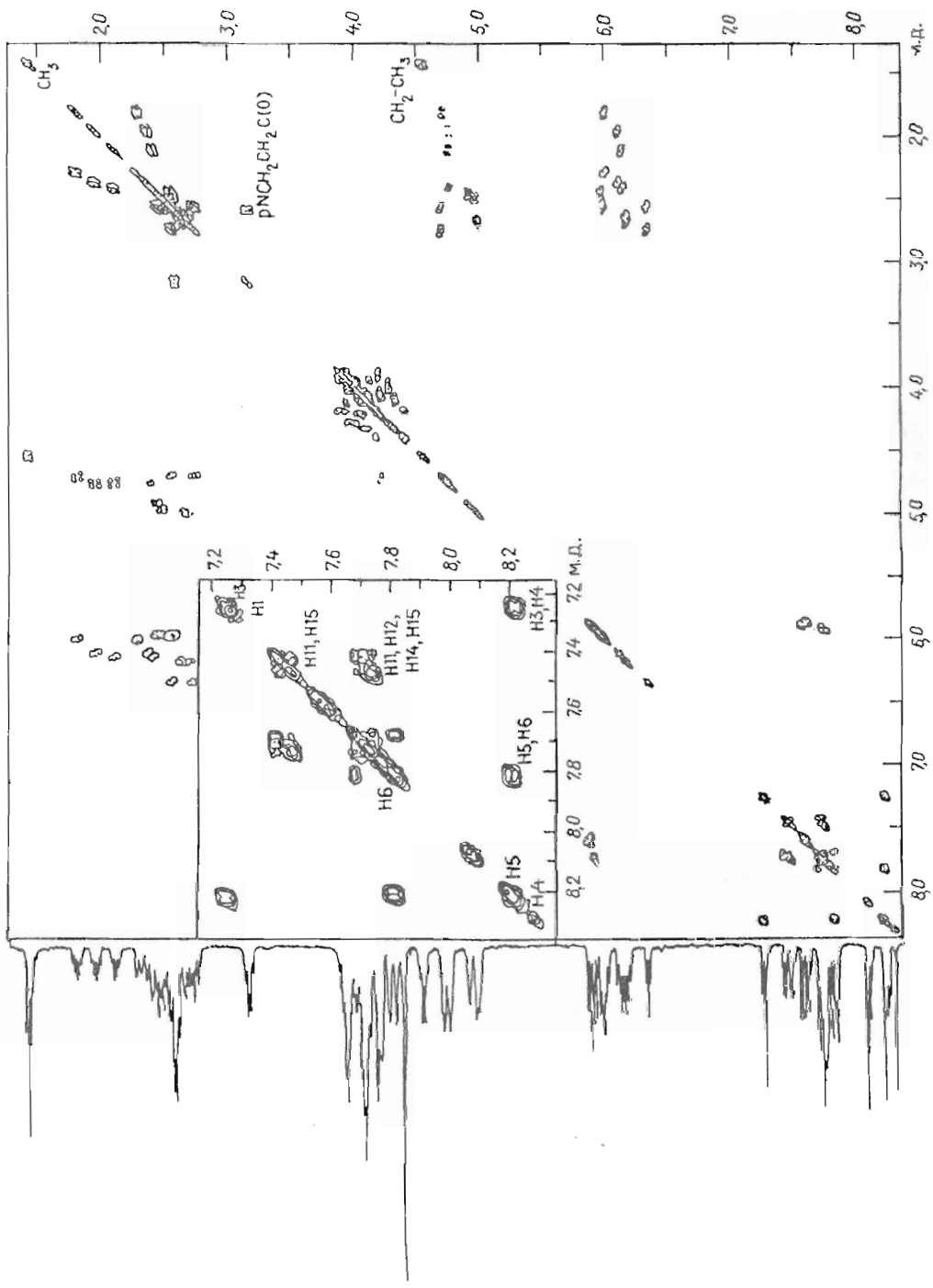


Рис. 2. Спектры флуоресценции соединений (IV) — (VIII) и EtdBr в воде (pH 6,5); концентрации 10^{-5} M; возбуждение светом с длиной волны 480, 415, 415, 480, 485 и 420 нм для EtdBr и соединений (IV) — (VIII) соответственно. Масштаб флуоресценции соединений (IV), (V) и (VIII) уменьшен в 2, 2 и 20 раз соответственно

Наличие остатка этидия в производном (IX) было доказано спектрами ЯМР, УФ и флуоресценции, а также хроматографическим поведением. Так, в спектре ^1H -ЯМР производного (IX) (рис. 3) в области слабого поля (8,5—7,0 м.д.) регистрируются сигналы всех ароматических протонов гетероциклических оснований олигонуклеотида рd(CCAAACA) в соответствии с данными работы [16], а также сигналы протонов этидиевого красителя. В 2M-COSY-спектре (рис. 3) регистрируются спиновые системы протонов H6 — H5 трех гетероциклических оснований дезоксицитидинов (1,2 и 6) и протонов 2'-деоксирибозы олигонуклеотида, а также ароматических и алифатических протонов остатка соединения (VII).

В УФ-спектре соединения (IX) (рис. 4) регистрируются полосы поглощения, характерные для красителя (ср. со спектром свободного соединения (VII)) и олигонуклеотида. О присутствии остатка красителя (VII) свидетельствуют также спектры флуоресценции (рис. 5). Время удерживания соединения (IX) при хроматографии на обращенной фазе (18,5 мин, система 2) значительно больше, чем для свободного олигонуклеотида (12 мин), как это наблюдается при хроматографии олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные группы (см., например, [17]). При анализе методом ионообменной хроматографии (система 3) время удерживания соединения (IX) (7 мин) значительно меньше, чем для немодифицированного олигонуклеотида рd(CCAAACA) (9,5 мин), что указывает на наличие положительно заряженного остатка красителя.

Таким образом, в настоящей работе синтезированы и охарактеризованы фотоактивные группы на основе этидиевого красителя и предложены способы их введения в олигонуклеотиды с целью получения производных, которые могут быть использованы в качестве аффинных реагентов для фотохимической модификации биополимеров. Данные по исследованию стабильности комплексов этидиевых производных олигонуклеотидов с комплементарными последовательностями и по фотохимической модификации олигонуклеотидов-мишеней в комплементарных комплексах будут приведены в следующей работе.



Флуориметрическое титрование красителей (VI), (VII), (VIII) и бромистого этидия с помощью ДНК из тимуса теленка

Соединение	Изменение флуоресценции $\frac{F_{\text{нас}}}{F_{\text{исх}}} \cdot 100\%$ *	Максимум длины волны флуоресценции, нм		Кол-во пар оснований ДНК на 1 молекулу красителя при насыщении
		исх.	конеч.	
EtdBr	996	615	602	4±1
(VI)	337	597	587	»
(VII)	598	614	601	»
(VIII)	6	497	501	»

* $F_{\text{исх}}$ — величина интенсивности флуоресценции красителя в отсутствие ДНК, $F_{\text{нас}}$ — величина интенсивности флуоресценции красителя, когда добавление новой порции ДНК не приводит к изменению интенсивности флуоресценции.

Относительная фотоактивность азидоэтидиевых производных

Соединение	Время полуфотоллиза (с) при $\lambda_{\text{обл}}$ (нм)				
	290—380	313	365	405	> 425
(IV)	8	120	60	1200	180
(V)	4	45	180	180	15
(VI) и (VII)	> 60000				
(VIII)	> 15000				

Экспериментальная часть

В работе использовали бромистый этидий (Fluka AG, Швейцария); β -аланин (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы (отечественного производства) были марки х.ч. или ос.ч.

Запись спектров ЯМР проводили на спектрометре AM-400 (Bruker, ФРГ). УФ-спектры записывали на спектрофотометре UV-2100 (Shimadzu, Япония), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония), ИК-спектры — на спектрометре Specord M80 (Carl Zeiss, Яена, ГДР).

ВЭЖХ и аналитическую хроматографию в микромасштабе проводили соответственно на хроматографах Waters (США) и Милихром (ПО «Научприбор», г. Орел) в следующих системах:

система 1: колонка 1×50 см; сорбент Lichrosorb 60 (10 мкм, Merck, ФРГ); линейный градиент концентраций элюента В в элюенте А от 0 до 10% за 60 мин (система 1А) или от 0 до 30% за 50 мин (система 1Б); скорость элюции 5 мл/мин; элюент А — 5% метанол в хлороформе; элюент В — 0,13 М трифторацетат аммония в метаноле;

система 2: колонка 0,4×25 см; сорбент Silasorb SPH C-18 (10 мкм, Chemapol, ЧСФР); линейный градиент концентрации ацетонитрила в 0,05 М перхлорате натрия от 0 до 30% за 40 мин; скорость элюции 2 мл/мин;

система 3: колонка 0,2×6 см; сорбент Lichrosorb-NH₂ (5 мкм, EM Laboratories,

Рис. 3. ¹H- и 2D-COSY-спектры ЯМР соединения (IX) в D₂O; 0,01 М калий-фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий 0,1 М NaCl и 0,01 мМ EDTA; концентрация 4 мМ; температура 60° С; в качестве внутреннего стандарта использовали 2,2-диметил-2-салавентин-5-сульфонат натрия (DSS). Обозначены кросс-пики взаимодействующих протонов этидиевого остатка и H5 — H6-протонов цитозина

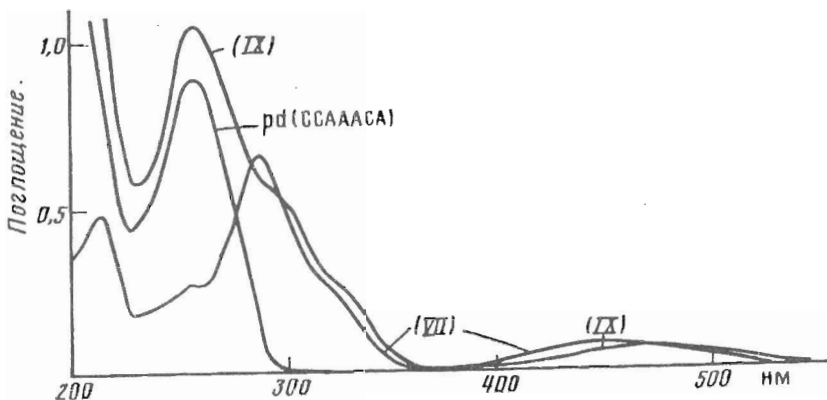


Рис. 4

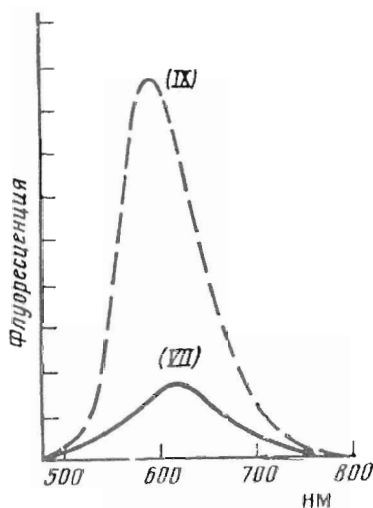


Рис. 5

Рис. 4. Спектры поглощения соединений (VII), (IX) и $\text{pd}(\text{CCAAACA})$ в воде; концентрация $1,1 \cdot 10^{-4}$ М

Рис. 5. Спектры флуоресценции соединений (VII) и (IX) в воде; концентрация $1,1 \cdot 10^{-5}$ М; возбуждение светом с длиной волны 485 нм

США); ступенчатый градиент концентрации (по 100 мкл: 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18; 0,20; 0,22; 0,24 М) фосфата калия (рН 7,4) в 40% водном формамиде; скорость элюции 100 мкл/мин.

N-Трифторацетил-3-аминопропионовая кислота. К 11,37 г (0,13 моль) 3-аминопропионовой кислоты и 50 мл хлороформа добавляли 40 мл (0,28 моль) трифторуксусного ангидрида и перемешивали при 20° С до полного растворения 3-аминопропионовой кислоты. Смесь упаривали до маслообразного состояния, добавляли 30 мл H_2O и упаривали досуха. Продукт кристаллизовали из этанола и сушили в вакууме над P_2O_5 . Получено 14,89 г (выход 61%). Т. пл. 113—115° С. ^1H -ЯМР: 2,28 м.д. (триплет), 3,72 м.д. (триплет), J_{H} , н 7,0 Гц. ИК (ν , см^{-1}): С=О 1710, С—F 1190, N—H 3305. Вычислено, %: С 32,4, Н 3,2, N 7,6. Найдено, %: С 32,1, Н 3,1, N 7,1.

Хлорангидрид N-трифторацетил-3-аминопропионовой кислоты. Смесь 6,04 г (0,032 моль) трифторацетил-3-аминопропионовой кислоты и 16 мл (0,22 моль) хлористого тионила в 50 мл сухого хлороформа кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч (до полного растворения осадка). Растворитель упаривали и перегоняли смесь в вакууме. Собирали фракцию с температурой кипения 116° С (13 мм рт. ст.). Получено 5,5 г (выход 83%) бесцветной жидкости. Титрование

азотнокислым серебром после щелочного гидролиза показало, что содержание активного хлора составляет 97% от теоретического.

Смесь 2- и 7-моноазидов этидия получали по методике [12] с некоторыми модификациями. Все операции проводили при освещении светом с длиной волны более 600 нм. К раствору 500 мг (1,26 ммоль) бромистого этидия в 40 мл водного раствора HCl (pH 1,6) при 5° С добавляли при интенсивном перемешивании 36,6 мг (0,43 ммоль) KNO₂, растворенного в 4 мл раствора HCl (pH 3,0). Через 10 мин к смеси добавляли 4 мл раствора HCl (pH 3,0), содержащей 30 мг (0,46 ммоль) NaN₃, выдерживали 5 мин, доводили pH смеси до 12, добавив необходимое количество 10 н. NaOH. Через 30 мин отфильтровывали выпавший темно-коричневый осадок, промывали его 5 мл холодной воды и растворяли в 10 мл раствора HCl с pH 2,8. Раствор наносили на колонку (2×30 см) с СМ-целлюлозой (Reanal, ВНР) и элюировали продукты разбавленным раствором HCl (pH 2,8). Были получены три фракции: 1 — (объем 50 мл) желтого цвета (диазид этидия), 2 — (50 мл) оранжевого цвета (смесь 2- и 7-моноазидов) и 3 — (500 мл) красно-оранжевого цвета (исходный этидий). Фракцию 2 упаривали, высушивали в вакууме, растворяли в 1 мл метанола и осаждали в 10 мл эфира. Получено 70 мг (выход 13,9%) смеси моноазидов этидия (I) и (II). ИК: 2120 см⁻¹ для N₃-, УФ: длинноволновый максимум поглощения в растворе HCl (pH 3,0) 459 нм.

7-Азидо, 2-N-(3-аминопропионил)этидий- и *2-азидо, 7-N-(3-аминопропионил)этидийгидроксиды (IV) и (V)*. К раствору 84,3 мг (0,21 ммоль) смеси 2- и 7-моноазидов этидия в 2 мл сухого DMF добавляли 73 мкл (0,5 ммоль) хлорангидрида N-трифторацетил-3-аминопропионовой кислоты. Через 30 мин смесь выливали в 50 мл эфира, осадок отфильтровывали, промывали 2 мл эфира и сушили в вакууме. Смесь разделяли методом ВЭЖХ в системе 1 (рис. 6). Фракции 1 (время удерживания 26 мин) и 2 (время удерживания 37 мин) содержали соответственно N-трифторацетильные производные изомеров (IV) и (V). Фракции упаривали, растворяли каждую в 1 мл 7 М раствора NH₃ в метаноле и выдерживали 24 ч при 21° С. Растворы упаривали и выделяли индивидуальные соединения (IV) и (V) методом ВЭЖХ в системе 2. Фракции, содержащие соединения (IV) (время удерживания 23 мин) и (V) (время удерживания 25,5 мин), упаривали, растворяли в воде, наносили на колонку (2×14 см) с СМ-сефадексом (40—120 мкм, Pharmacia, Швеция), промывали 100 мл воды и элюировали линейным градиентом (2×50 мл) концентрации триэтиламонийкарбоната (pH 8,5) (от 0 до 1 М). Фракции упаривали с водой до полного удаления бикарбоната триэтиламония. Получено 27,6 мг соединения (IV) (выход 26,8%) и 10,8 мг (10,2%) соединения (V). ИК: 2010 см⁻¹ для (IV) и (V). Данные ЯМР: см. табл. 1.

2-N-(3-Аминопропионил)этидий-, 7-N-(3-аминопропионил)этидий- и *2-N-, 7-N-ди(3-аминопропионил)этидийгидрохлориды (VI), (VII) и (VIII)*. К раствору 500 мг (1,27 ммоль) бромистого этидия в 15 мл сухого DMF при -20° С в течение 10 мин добавляли при интенсивном перемешивании 1,5 мл смеси трифторуксусного ангидрида и хлорангидрида N-трифторацетил-3-аминопропионовой кислоты (1 : 1 по объему). Смесь выливали в 0,5 л сухого серного эфира, осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. К порошку добавили 60 мл воды, нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием. Супернатант упаривали до объема 0,5 мл, осаждали продукты 25-кратным избытком ацетона, промывали осадок ацетоном и сушили в вакууме. Смесь растворяли в 1 мл 7 М NH₃ в метаноле, выдерживали при 20° С 24 ч, раствор упаривали и разделяли смесь (по 30—40 мг) на индивидуальные соединения (VI) — (VIII) методом ВЭЖХ в системе 2. Фракции, соответствующие индивидуальным соединениям (VI) — (VIII) (времена удерживания 26,5; 30 и 35 мин соответственно), упаривали, растворяли в воде и рехроматографировали на колонке с СМ-сефадексом в тех же условиях, как для соединений (IV) и (V) (см. выше). Получено 35 мг (7,6%) соединения (I), 40 мг (8,5%) соединения (II) и 108 мг (20,5%) соединения (III). В СГ-форму красители переводили, пропуская их водные растворы через колонку (1×16 см) с Dowex 1×4 (50—100 мкм, Dow, США) в СГ-форме. Для

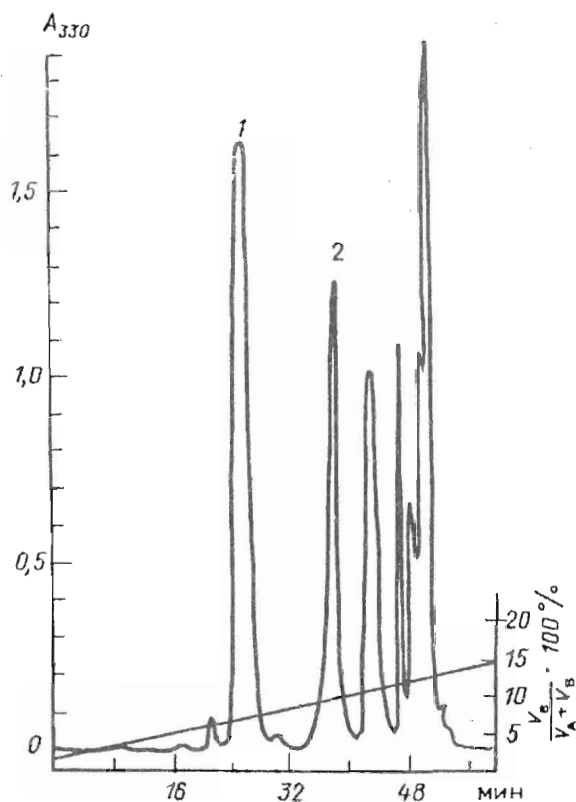


Рис. 6. Хроматографический профиль разделения при синтезе трифторацетильных производных (IV) (пик 1) и (V) (пик 2) в системе 1А

соединений (I) и (II) вычислено, %: С 63,0, Н 5,7, N 12,3. Найдено, %: С 62,8, Н 5,6, N 12,1. Для соединения (III) вычислено, %: С 57,4, Н 5,7, N 12,4. Найдено, %: С 57,4, Н 5,7, N 12,4. Данные спектров ^1H -ЯМР приведены в табл. 1.

Определение коэффициентов экстинкции соединений (IV) — (VIII) проводили, измеряя оптическую плотность растворов с известной концентрацией. Последнюю вычисляли по соотношению интенсивности сигналов протонов красителей и стандарта с известной концентрацией в спектрах ^1H -ЯМР. Точность определений $\pm 5\%$.

Флуориметрическое титрование бромистого этидия и соединений (VI) — (VIII) ДНК. К 2 мл раствора красителя с концентрацией $1,4 \cdot 10^{-5}$ М в 0,01 М калий-фосфатном буфере (рН 7,70) при 20°C добавляли порциями по 10 мкл раствор ДНК из тимуса теленка с концентрацией 86 ОЕ₂₆₀/мл и записывали спектры флуоресценции. Длина волны возбуждения 430 нм в случае соединения (VIII) и 480 нм для красителей (VI), (VII) и бромистого этидия.

Фотолиз этидиевых и азидоэтидиевых красителей осуществляли облучением образцов светом ртутной лампы высокого давления ДРК-120 осветителя ОИ-18А (ЛОМО, Санкт-Петербург) с набором стеклянных фильтров: ЖС-3 УФС-2 (303—313 нм), $W = 1 \cdot 10^{-4}$ Вт·см⁻²·с⁻¹; БС-7 УФС-6 (365 нм), $W = 1,5 \cdot 10^{-4}$ Вт·см⁻²·с⁻¹; ЖС-10 ПС-13 (405 нм), $W = 1,5 \cdot 10^{-4}$ Вт·см⁻²·с⁻¹; УФС-1 УФС-2 (290—380 нм), $W = 5 \cdot 10^{-4}$ Вт·см⁻²·с⁻¹; ЖС-11 (> 425 нм). Облучение проводили до прекращения изменений в спектре или резкого нарушения изобестических точек.

Олигодезоксирибонуклеотид рd(ССАААСА) любезно предоставлен Т. В. Абрамовой (НИБХ, СО РАН). Синтез проведен согласно работе [18].

Этидиевое производное гептануклеотида рd(ССАААСА) (IX). 10 ОЕ₂₆₀ (0,15

мкмоль) цетавлоновой соли $\text{pd}(\text{ССАААСА})$ растворяли в 40 мкл абсолютного DMSO и добавляли к раствору смесь 2,0 мг (7,6 мкмоль) трифенилфосфина и 1,7 мг (7,6 мкмоль) 2,2'-дипиридилдисульфида. Через 10 мин в смесь добавляли 1 мг (4,5 мкмоль) 4-N,N-диметиламинопиридина, выдерживали 15 мин и осаждали нуклеотидный материал 10-кратным объемом 2% раствора LiClO_4 в ацетоне. Осадок 4-N,N-диметиламинопиридиниевого производного гептануклеотида промывали ацетоном, растворяли в 60 мкл 0,01 М калий-фосфатного буфера (рН 10,3), содержащего 100 ОЕ₂₈₈ (1,8 мкмоль) соединения (VII), и выдерживали в течение 1 ч. Продукты осаждали 10-кратным объемом 2% раствора LiClO_4 в ацетоне и выделяли соединение (IX) методом обращенно-фазовой хроматографии в системе 2. Получено 10,8 ОЕ₂₆₀ соединения (IX) (выход 92%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waring M. J. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 269—282.¹
2. LePecq J. B., Paoletti C. J. // J. Mol. Biol. 1967. V. 27. № 1. P. 87—106.
3. Actipis S., Martz W. W. // Biochemistry. 1974. V. 13. № 1. P. 112—118.
4. Krygh T. R., Reinhardt C. G. // J. Mol. Biol. 1975. V. 97. № 2. P. 133—162.
5. Tsai S., Jain S. C., Sobel H. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 2. P. 628—632.
6. Беницкая Л. З., Козионов А. Л., Новожилов С. Ю., Штокман М. И. // Универсальность нелинейного лазерного разрезания ДНК по типу красителя. Препринт ИАиЭ СО АН СССР № 230. Новосибирск, 1984.
7. Cariello N. F., Keohavong P., Sanderson B. J. S., Thilly W. E. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 4157.
8. Letsinger R., Scott M. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 24. P. 628—632.
9. Benimetskaya L. Z., Bulychov N. V., Koshkin A. A., Kozionov A. L., Lebedev A. V., Novozilov S. Yu., Stokman M. I. // Biopolymers. 1989. V. 28. № 6. P. 1129—1147.
10. Koshkin A. A., Lebedev A. V., Ryte A. S., Vlassov V. V. // Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1—3. P. 541—542.
11. Likhova I. A., Nevinsky G. A., Godovikova T. S., Ivanova E. M., Koshkin A. A., Sergeev D. S., Frolova E. I., Rudenko N. K., Khomov V. V., Kausan V. M., Zarytova V. F., Lavrik O. I. // FEBS Lett. 1991. V. 281. № 1—2. P. 111—113.
12. Graves D. E., Yielding L. W., Watkins C. L., Yielding K. L. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 479. № 1. P. 98—104.
13. Сильверстен Р., Баслер Г., Моррил Т. // Спектрометрическая идентификация органических соединений. М.: Мир, 1977. С. 329.
14. Добриков М. И., Приходько Т. А., Сафронов И. В., Шишкин Г. В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18—23.
15. Годовикова Т. С., Зарытова И. Ф., Халимская Л. М. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
16. Биченкова Е. В., Денисов А. Ю., Кутявин И. В., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1498—1507.
17. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. И., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
18. Абрамова Т. В., Комарова Н. И., Мундус Д. А., Перебоева О. С. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1990. Вып. 5. С. 45—51.

Поступила в редакцию
7.IV.1992

После доработки
1.VII.1992

*A. A. Koshkin, T. M. Ivanova, N. V. Bulychev,
M. I. Dobrikov, A. V. Lebedev*

**PHOTOREACTIVE ETHIDIUM AND AZIDOETHIDIUM DYES.
SYNTHESIS, PROPERTIES AND COVALENT BINDING TO
OLIGODEOXYNUCLEOTIDES**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk*

Methods of synthesis of ethidium and azidoethidium dyes, containing the primary aliphatic amino group of the 3-aminopropionic acid residue were developed. The derivatives were characterized by spectral methods (NMR, UV- and fluorescent spectroscopy). Complex formation of ethidium dyes with DNA was studied by fluorescent technique. The stoichiometry of the dye — DNA complex was 1 : 4 (dye to base pair) for all the derivatives. Photoreactivity of azidoethidium dyes was 10^3 times higher and the quantum yield of the photoproducts was 10^5 times higher than those for ethidium dyes. A method of preparation of 5'-phosphoramidate photoreactive oligodeoxynucleotide derivatives was suggested, with ethidium derivative of heptanucleotide pd(CCAAACA) as an example.