

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ
ФОТОНИКА

УДК 544.52

**САМОТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НОЕCHST 33258 И SYBR GREEN I
НА МАТРИЦЕ ХОЛЕСТЕРИЧЕСКОЙ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ДНК**

© 2019 г. В. Н. Морозов^а, *, В. А. Кузьмин^а

^аИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук
Россия 117997, Москва, ул. Косыгина, 4

*E-mail: morozov.v.n@mail.ru

Поступила в редакцию 16.08.2018 г.

После доработки 24.10.2018 г.

Принята к публикации 26.10.2018 г.

DOI: 10.1134/S0023119319020104

ДНК-специфичные лиганды демонстрируют явление самотушения флуоресценции при взаимодействии с биомакромолекулами [1, 2]. Это явление наблюдается в случае близкого (менее 10 нм) расположения хромофоров при высоких концентрациях лигандов и происходит за счет образования нефлуоресцирующего комплекса, безызлучательного переноса энергии или переноса электрона между флуорофорами [3]. Самотушение флуоресценции также наблюдается в условиях плотной упаковки ДНК в биологических системах [4]. В некотором приближении упаковку ДНК *in vivo* способны моделировать молекулярно-организованные ансамбли, например, холестерические жидкокристаллические дисперсии (ХЖКД) ДНК [5, 6]. При взаимодействии с такими пространственно-упорядоченными модельными системами большое значение приобретают размерные и структурные особенности лигандов, а также строение их комплексов с ДНК. Известно несколько типов нековалентного взаимодействия низкомолекулярных лигандов с ДНК: внешнее связывание, интеркаляция между парами оснований и связывание в бороздке [7]. В настоящем сообщении приведены результаты исследования самотушения флуоресценции интеркалятора SYBR Green I (SG) и АТ-специфичного узкобороздочного лиганда Hoechst 33258 (Ht58) на матрицах ДНК и ХЖКД ДНК.

ХЖКД ДНК получали смешением в пропорции 1 : 1 водно-солевого раствора низкомолекулярной ДНК с 34% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) [6]. Водно-солевой раствор ДНК готовили на основе 10^{-2} М фосфатного (NaH_2PO_4) буфера, содержащего 0.3 М NaCl (рН ~ 7.4) с использованием 7.5×10^{-5} М ($\epsilon_{260} \approx 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) коммерческого препарата ДНК (Деринат®, Россия). ПЭГ с молекулярной массой 4000 Да (Merck, Германия) использовали без дополни-

тельной очистки. Использовали коммерческие красители SYBR Green I и Hoechst 33258 (Sigma, США). Концентрации красителей определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{498} \approx 73000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SG) [8], $\epsilon_{343} \approx 42000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ht58) [9]. Спектры поглощения были получены на спектрофотометре UV-Vis 3101 PC (Shimadzu, Япония). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF5301PC (Shimadzu, Япония). Времена жизни флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре FluoTime 300 (PicoQuant, Германия). Все измерения проводили в кварцевых кюветках (0.2×1.0 см). Оптический путь возбуждающего света составлял 0.2 см.

В органических растворах концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции красителей имеет линейный характер, поскольку взаимодействие хромофоров отсутствует из-за больших расстояний между ними. При наличии в растворе молекул субстрата, белков или нуклеиновых кислот, связывающих флуоресцирующие лиганды, реализуется микрофазная модель, согласно которой локализация флуорофоров происходит в основном на макромолекулярной матрице, в то время как их концентрация в растворе пренебрежимо мала [10]. В настоящем сообщении матрицей, связывающей Ht58 и SG, являлись молекулы ДНК в растворе, а также низкомолекулярные ДНК конденсированные ПЭГ в частицы ЖКД с холестерической закруткой слоев, обеспечивающие взаимодействие хромофоров на расстояниях ~3.4 нм [6]. Такое близкое расположение молекул Ht58 и SG в микрофазе ХЖКД ДНК приводит к самотушению флуоресценции, которое сопровождается изменением времен жизни возбужденного состояния Ht58 ($\tau_1 = 2$ нс, $\tau_2 = 4.1$ нс (6×10^{-7} М), $\tau_1 = 1.7$ нс, $\tau_2 = 3.6$ нс (6×10^{-5} М)); SG ($\tau_1 = 4.5$ нс (6×10^{-7} М), $\tau_1 = 3.1$ нс

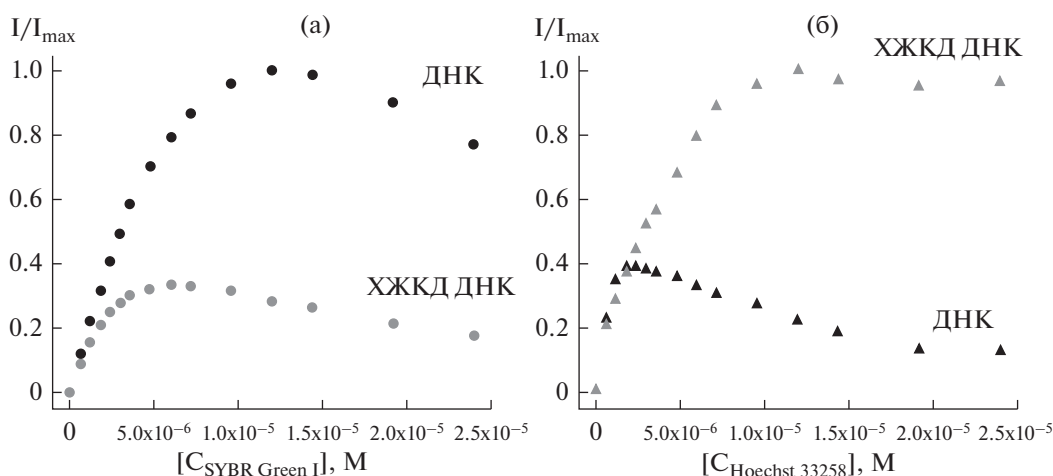


Рис. 1. Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции SYBR Green I (а) и Hoechst 33258 (б) в ДНК и ХЖКД ДНК от концентрации красителей.

(1.2×10^{-5} M)). Уменьшение времени жизни флуоресценции красителей при увеличении их концентрации согласуется с полученными ранее результатами [2] и свидетельствует о переносе энергии по механизму homo-FRET. Кривые самотушения флуоресценции красителей (рис. 1) имеют характерный для этого процесса вид [11], однако характер зависимостей в растворе ДНК и молекулярно-организованном ансамбле ХЖКД ДНК значительно отличается для SG и Ht58. Структура комплекса SG одинакова для раствора ДНК и конденсированной мезофазы, где флуорофор защищен от взаимодействия с другими молекулами ДНК. Структура частиц ХЖКД ДНК способствует сближению хромофоров, интеркалированных между парами оснований соседних двойных спиралей, что приводит к самотушению флуоресценции при меньших концентрациях SG по сравнению с ДНК в растворе.

Концентрационные зависимости интенсивности флуоресценции Ht58 имеют иной характер. При малых концентрациях молекулы Ht58 занимают наиболее выгодные сайты связывания с ДНК, однако с ростом концентрации красителя таких сайтов становится меньше, что приводит к димерному связыванию и образованию комплексов с более сложной стехиометрией [12]. В растворе ДНК эффективное самотушение флуоресценции Ht58 происходит в первую очередь за счет димеров, образование которых при малых концентрациях залегателя ограничено в ХЖКД ДНК стерическим фактором. При возрастании концентрации Ht58 происходит изменение шага холестерической закрутки слоев в частицах дисперсии, наблюдаемое по уменьшению амплитуды аномальной отрицательной полосы в области поглощения азотистых оснований (~ 280 нм) на спектре кругового дихроизма ХЖКД ДНК (дан-

ные не приведены). Переход холестерической упаковки ДНК в более упорядоченную мезофазу маловероятен, поскольку сопровождался бы значительно более эффективным самотушением флуоресценции [2] за счет уменьшения расстояния между соседними слоями до ~ 2.6 нм [13, 14]. Известно, что интеркалирующие соединения способны препятствовать конденсации высокомолекулярной ДНК за счет увеличения персистентной длины молекулы [15], однако изменение длины и увеличение жесткости ДНК при связывании SG в исследуемых концентрациях не влияет на упаковку низкомолекулярных ДНК в частицах ХЖКД. В отличие от интеркалиаторов связывание залегателей не приводит к изменениям структуры ДНК [7], однако если интеркалированный краситель экранирован азотистыми основаниями от взаимодействия с окружающими молекулами [16], в случае образования комплекса залегания стерические препятствия для взаимодействия Ht58 с соседними сайтами значительно меньше [17–19]. Таким образом, плотная упаковка ДНК управляет связыванием Ht58, а узкобороздочный комплекс сильнее влияет на пространственную организацию компактизированной ДНК, чем интеркалирующий, что существенно отличает поведение Ht58 в молекулярно-организованных системах с высокой плотностью упаковки от поведения в растворе ДНК.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gudnason H., Dufva M., Bang D.D., Wolff A. // *Nucleic acids res.* 2007. V. 35. P. e127.

2. Лисицына Е.С., Дурандин Н.А., Калюжный Д.Н., Кузьмин В.А. // Химия высоких энергий. 2013. Т. 47. № 1. С. 39.
3. Chen R.F., Knutson J.R. // Anal. Biochem. 1988. V. 172. P. 61.
4. Estandarte A.K., Botchway S., Lynch C., Yusuf M., Robinson I. // Sci. rep. 2016. V. 6. 31417.
5. Livolant F. // Physica A. 1991. V. 176. P. 117.
6. Евдокимов Ю.М., Саянов В.И., Семенов С.В., Скурин С.Г. Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК. М.: Радиотехника, 2008.
7. Blackburn G.M., Gait M.J., Loakes D., Williams D.M. Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006.
8. Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. // Nucleic acids res. 2004. V. 32. P. e103.
9. Latt S.A., Wohlleb J.C. // Chromosoma. 1975. V. 52. P. 297.
10. Kuzmin M.G., Soboleva I.V., Durandin N.A., Lisitsyna E.S., Kuzmin V.A. // J. Phys. Chem. B. 2014. V. 118. P. 4245.
11. Hamann S., Kiilgaard J.F., Litman T., Alvarez-Leefmans F.J., Winther B.R., Zeuthen T. // J. Fluoresc. 2002. V. 12. P. 139.
12. Bazhulina N.P., Nikitin A.M., Rodin S.A., Surovaya A.N., Kravatsky Y.V., Pismensky V.F., Archipova V.S., Martin R., Gursky G.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2009. V. 26. P. 701.
13. Livolant F., Leforestier A. // Prog. Polym. Sci. 1996. V. 21. P. 1115.
14. De Frutos M., Leforestier A., Livolant F. // Biophys. Rev. and Lett., 2014. V. 9. P. 81.
15. Rocha M.S., Cavalcante A.G., Silva R., Ramos E.B. // J. Phys. Chem. B. 2014. V. 118. P. 4832.
16. Geacintov N.E., Waldmeyer J., Kuzmin V.A., Kolubaev T. // J. Phys. Chem. 1981. V. 85. P. 3608.
17. Saito M., Kobayashi M., Iwabuchi S., Morita Y., Takamura Y., Tamiya E. // J. Biochem. 2004. V. 136. P. 813.
18. Saito M., Takamura Y., Tamiya E. // NanoBiotechnology 2005. V. 1. P. 361.
19. Silva E.F., Ramos E.B., Rocha M.S. // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. P. 7292.