



УДК 577.113.6

**СИНТЕЗ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ,
СОДЕРЖАЩИХ НОВУЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНУЮ МЕТКУ –
n-(2-БЕНЗОКСАЗОЛИЛ)ТОЛАН**© 2001 г. А. Д. Малахов, В. А. Коршун, Ю. А. Берлин[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 09.06.2001 г. Принято к печати 26.06.2001 г.

Синтезировано функциональное (дигидроксibuтильное) производное новой для биополимеров флуоресцентной метки – *n*-(2-бензоксазолил)толана. Полученный на его основе функционализированный твердофазный носитель использован в синтезе олигонуклеотидов, 3'-терминально меченных бензоксазолилтоланом (олигомеры содержат также остатки 1-фенилэтинилпирена). Этот флуорофор в составе самого дигидроксibuтильного производного и модифицированных им олигонуклеотидов проявляет интенсивную флуоресценцию, характеризующуюся высоким стоксовым сдвигом. Получаемые на основе этого флуорофора меченые олигонуклеотиды являются потенциальными зондами, чувствительными к микроокружению биополимера.

Ключевые слова: модифицированные нуклеозиды; модифицированные олигонуклеотиды; *n*-(2-бензоксазолил)толан; 1-фенилэтинилпирен.

Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие ковалентно присоединенные флуоресцентные красители, находят широкое применение в исследовании нуклеиновых кислот [1, 2]. Так, флуоресцентно меченные олигонуклеотиды применяются для автоматизированного секвенирования ДНК, в качестве ДНК-зондов и праймеров для ПЦР. Они также используются при изучении нуклеиновых кислот в методах, основанных на изменении эмиссии взаимодействующих флуорофоров [3–5]. В связи с этим весьма актуальной представляется проблема получения флуоресцентных красителей с заданными спектральными свойствами и методов их введения в олигонуклеотиды. Наиболее удобно введение флуоресцентных меток с использованием стандартных методов автоматизированного твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов.

К числу перспективных красителей с интересными флуоресцентными свойствами относятся некоторые ароматические гетероциклические соединения, например, производные бензоксазола. Такие соединения обладают высокими квантовыми выходами флуоресценции [6, 7] и используются, в частности, в качестве оптических отбеливателей, органических скинтилляторов и лазерных красителей [8–10].

На основе 2-[4-(фенилэтинил)фенил]бензоксазола мы разработали синтез нового производного этого флуорофора (III), а также твердофазного носителя (V), содержащего этот гетероцикл (схема).

Исходными веществами в синтезе явились 2-(4-этинилфенил)бензоксазол (II) [11] и 4-(4-иодфенил)бутандиол-1,3 (I) [12]. Их сочетанием в условиях реакции Хека–Соногаширы [13] (палладиево-медный катализатор в присутствии органического основания) был получен 4-[4-(2-бензоксазолил)фенилэтинил]фенилбутандиол-1,3 (III) (выход 91%), охарактеризованный спектром ЯМР [¹H-ЯМР (Py-*d*₅; δ): 8.21 (д, 2 H, J 8 Гц, ArH), 7.80–7.77 (м, 1 H, ArH), 7.66 (д, 2 H, J 8 Гц, ArH), 7.55–7.51 (м, 3 H, ArH), 7.33 (д, 2 H, J 8 Гц, ArH), 7.30–7.25 (м, 2 H, ArH), 4.38 (квин, 1 H, J 6.5 Гц, CH₂CH(OH)CH₂), 4.16–4.03 (м, 2 H, CH₂CH₂OH), 2.97–2.87 (м, 2 H, ArCH₂CH(OH)), 1.96 (кв, 2 H, J 6.5 Гц, CH(OH)CH₂CH₂(OH))] и масс-спектром [MALDI-TOF (*m/z*)⁺: найдено 384.3 (*M* + H); рассчитано 383.45 (C₂₅H₂₁NO₃)]. Это соединение содержит первичную и вторичную гидроксильные группы, соединенные цепочкой из трех атомов углерода и моделирующие соответствующие 3'- и 5'-гидроксилы природных нуклеозидов. Введение по первичному гидроксилу защитной 4,4'-диметокситрильной группы привело к одноатомному спирту (IV), который под действием диизопротилкарбодиимида конденсировали с *N*-сукцинированным полимерным носителем LCAA-CPG [14, 15]. В результате был получен *n*-(2-бензокса-

Сокращения: DMAP – 4,4-диметиламинопиридин; DMTг – 4,4'-диметокситрилит; LCAA-CPG – аминоалкилированное стекло с определенным размером пор.

[#] Автор для переписки (эл. почта: yuber@ibch.ru).

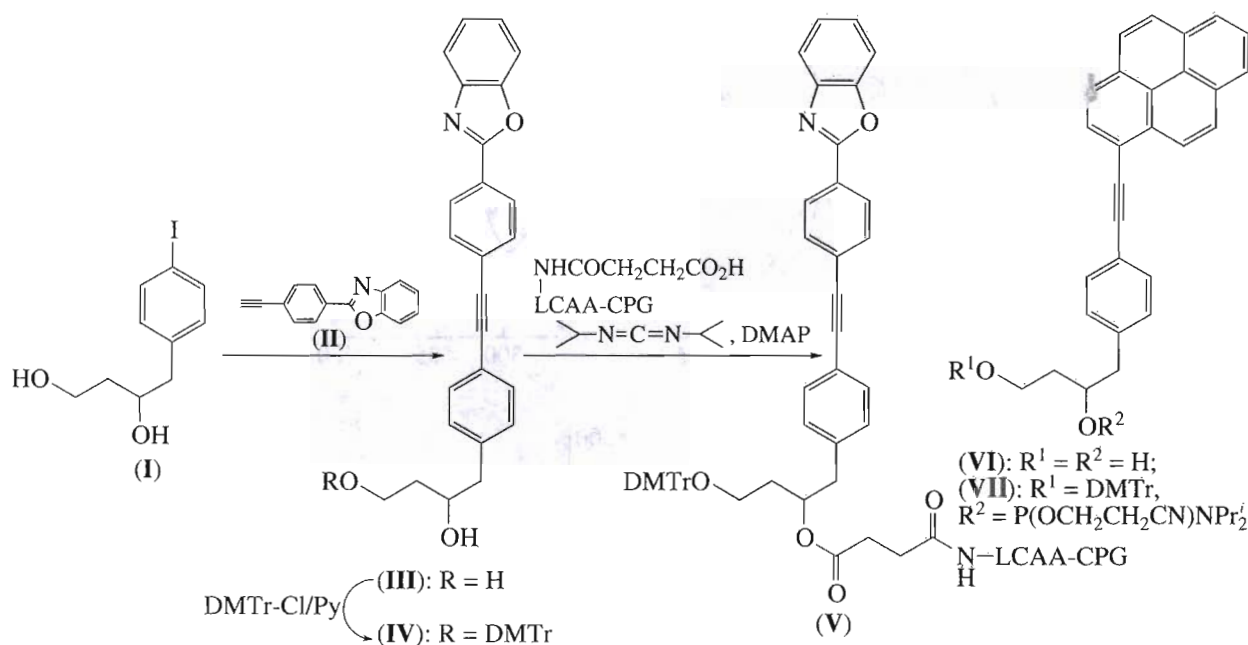


Схема.

золил)толановый носитель (V) с содержанием якорного флуорофора 27 мкмоль/г.

На носителе (V) в стандартных условиях олигонуклеотидного синтеза была получена серия меченных бензоксазолилтоланом олигонуклеотидов, в том числе содержащих в качестве второго флуорофора 1-фенилэтинилпиреновое производное (VI), которое вводили с помощью соответствующего амидофосфитного реагента (VII) [11]. Олигонуклеотидные конъюгаты выделяли последовательно электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ и обращенно-фазовой ВЭЖХ и характеризовали масс-спектрометрией MALDI-TOF (для некоторых из синтезированных соединений данные приведены в таблице). Как и следовало ожидать, модификации стандартных нуклеотидных цепей, связанные с введением гидрофобных заместителей,

существенно увеличивают время удерживания конъюгатов при обращенно-фазовой хроматографии.

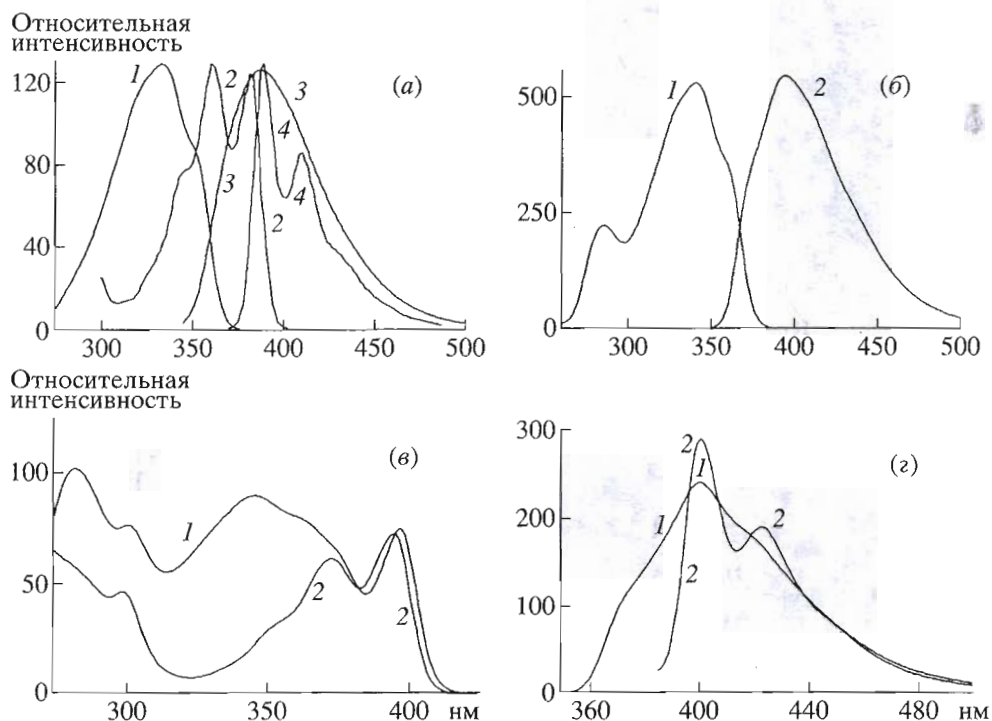
Полученные конъюгаты, как и исходные бугандиольные производные красителей, (III) и (VI), проявляют интенсивную флуоресценцию; спектры, по форме практически не отличаясь от спектров исходных псевдонуклеозидов, немного (примерно на 10 нм) сдвинуты в красную область (рисунок а, б).

Интересной особенностью спектров флуоресценции конъюгата, несущего *n*-(2-бензоксазолил)толановый флуорофор, является их большой стоксов сдвиг (примерно 55 нм). По-видимому, это связано с тем, что молекула данного флуорофора, включающая в себя электроотрицательные атомы, должна обладать значительным дипольным моментом и, как следствие, сильно взаимодействовать с

Таблица

Структура (5' → 3')*	Время удерживания, мин**	Мол. масса	
		Найдено (MALDI-TOF)***	Вычислено
TGT-ATT-ATT-TTA-TTT-TTT-TAT-CCX	25.1	7415.2 (M + Li)	7409.92
TGT-ATT-ATT-TTA-TTT-YTT-TAT-CCX	29.1	7564.8 (M + Li)	7559.17
TGT-ATT-ATY-TTA-TTT-TTT-TAT-CCX	27.8	7566.7 (M + Li)	7559.17

* X – остаток *n*-(2-бензоксазолил)толана; Y – остаток фенилэтинилпирена; ** для ВЭЖХ использовалась колонка с обращенной фазой C-18 SOTA 4.5 × 250 мм, линейный градиент (5 → 50%) MeCN в 0.1 M NH₄OAc в течение 60 мин (хроматограф Beckman 165, США); *** прибор Voyager-DE BioSpectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems; time-of-flight mass spectrometer with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF)).



Нормализованные спектры флуоресцентных псевдонуклеозидов и меченных ими олигонуклеотидов:

а – спектры возбуждения *n*-(2-бензоксазолил)толанового диола (III) (λ_{em} 400 нм) (1) и 1-фенилэтинилпиренового диола (VI) (λ_{em} 440 нм) (2), спектры флуоресценции диола (III) (λ_{ex} 335 нм) (3) и диола (VI) (λ_{ex} 320 нм) (4) в MeOH (c 10^{-6} М);

б – спектры возбуждения (регистрация по эмиссии на 400 нм) (1) и флуоресценции (возбуждение при λ_{ex} 335 нм) (2) олигонуклеотида (5')TGT-ATT-ATT-TTA-TTT-TTT-TAT-CCX (X – остаток *n*-(2-бензоксазолил)толана), концентрация олигонуклеотидов (здесь и далее) 5×10^{-7} М в К-фосфатном буфере, pH 7.0; *в* – спектры возбуждения (регистрация по эмиссии на 460 нм) олигонуклеотидов (5')TGA-TTT-TAT-TTY-TTT-ATC-CX (1) и (5')ACG-AGG-YAA-GCG-TAA (2) (Y – остаток фенилэтинилпирена); *г* – спектры флуоресценции смеси мономодифицированных олигонуклеотидов (5')TGT-ATT-ATT-TTA-TTT-TTT-TAT-CCX и (5')ATT-ATT-TTY-TTT-TTT-TAT при λ_{ex} 335 (1) и 375 нм (2).

полярным растворителем. Обычно в электроновозбужденных состояниях у ароматических соединений дипольный момент больше, чем в основном состоянии. Поэтому при поглощении флуорофором фотона его диполь, оказывающий возмущающее действие на окружение флуорофора, изменяется. Вслед за возбуждением происходит реорганизация диполей молекул растворителя, окружающих люминофор, что приводит к безызлучательной потере части энергии возбуждения и длинноволновому сдвигу флуоресценции. Таким образом, данный флуорофор в принципе можно использовать в качестве индикатора полярности тех участков в составе биополимеров, с которыми этот флуорофор контактирует.

Была исследована возможность безызлучательного переноса энергии флуоресценции с *n*-(2-бензоксазолил)толана на фенилэтинилпирен. В спектрах возбуждения олигонуклеотидов, содержащих остатки этих красителей, при регистрации эмиссии при 460 нм, которая соответствует максимуму флуоресценции фенилэтинилпирена, четко заметен максимум при 346 нм, характерный для *n*-(2-

бензоксазолил)толана (рисунок *в*). Это свидетельствует о том, что возбуждение фенилэтинилпирена может происходить путем безызлучательного переноса энергии с *n*-(2-бензоксазолил)толана. В то же время из-за большого стока сдвига у *n*-(2-бензоксазолил)толана спектры флуоресценции фенилэтинилпирена и *n*-(2-бензоксазолил)толана сильно перекрываются. Действительно, при возбуждении системы светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения *n*-(2-бензоксазолил)толана (λ_{ex} 335 нм), наблюдается также частичное возбуждение фенилэтинилпирена. Так, максимум, характерный для *n*-(2-бензоксазолил)толана, сглаживается и появляется широкий максимум, характерный для фенилэтинилпирена (рисунок *г*). Было также обнаружено (наши неопубликованные данные), что при расположении двух остатков *n*-(2-бензоксазолил)толана у соседних звеньев в составе олигонуклеотида (подобно аналогичному расположению двух остатков фенилэтинилпирена [16]) может образовываться эксимер. Это свойство данного флуорофора может

быть использовано для конструирования чувствительных ДНК-зондов.

Авторы благодарны И.И. Михалеву и И.В. Грешишниковой за регистрацию спектров флуоресценции. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 00-03-32701, № 00-15-97947 и № 01-03-06124).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lakowicz J.P.* // Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
2. *Haugland R.P.* // Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Eugene, OR: Molecular Probes, 1996.
3. *Masuko M., Ohuchi S., Sode K., Ohtani H., Shimadzu A.* // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. e34.
4. *Kandimalla E.R., Agrawal S.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000. V. 8. P. 1911–1916.
5. *Zhang P., Beck T., Tan W.* // Angew. Chem., Int. Ed. 2001. V. 40. P. 402–405.
6. *Пушкина Л.Н., Ткачев В.В.* // Журн. прикл. спектроскопии. 1964. Т. 1. С. 275–279.
7. *Reiser A., Leyshon L.J., Saunders D., Mijovic M.V., Bright A., Bogie J.* // J. Am. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 2414–2421.
8. *Базыль О.К., Грузинский В.В., Данилова В.И., Копылова Т.Н., Майер Г.В.* // Оптика и спектроскопия. 1980. Т. 48. С. 262–266.
9. *Борисевич Н.А., Гореленко А.Я., Казак Н.С., Калоша И.И., Моргун Ю.Ф., Агаишлов А.В., Толкачев В.А., Тугбаев В.А.* // Журн. прикл. спектроскопии. 1980. Т. 32. С. 357–359.
10. *Васильева О.А., Гореленко А.Я., Давыдов С.В., Калоша И.И., Толкачев В.А.* // Журн. прикл. спектроскопии. 1987. Т. 46. С. 642–645.
11. *Korshun V.A., Prokhorenko I.A., Gontarev S.V., Skorobogatyi M.V., Balakin K.V., Manasova E.V., Malakhov A.D., Berlin Yu.A.* // Nucleosides Nucleotides. 1997. V. 16. P. 1461–1464.
12. *Малахова Е.В., Малахов А.Д., Кузнецова С.В., Варнавский О.П., Кадуцкий А.П., Кожич Д.Т., Коршун В.А., Берлин Ю.А.* // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 688–695.
13. *Sonogashira K., Tohda Y., Hagihara N.* // Tetrahedron Lett. 1975. P. 4467–4470.
14. *Damha M.J., Giannaris P.A., Zabarylo S.V.* // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3813–3821.
15. *Caruthers M.H., Barone A.D., Beaucage S.L., Dodds D.R., Fisher E.F., McBride L.J., Matteucci M., Stabinsky Z., Tang J.-Y.* // Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 287–313.
16. *Малахов А.Д.* // Синтез и спектральные свойства флуоресцентных фенилэтинилпиреновых и бис(фенилэтинил)антраценовых псевдонуклеозидов и меченных ими олигонуклеотидов. Дис. ... на соискание ученой степени канд. хим. наук. М.: ИБХ РАН, 2000.

Synthesis and Fluorescent Characteristics of Oligodeoxynucleotides Containing a Novel Fluorescent Label, *p*-(2-Benzoxazolyl)tolane

A. D. Malakhov, V. A. Korshun, and Yu. A. Berlin[#]

[#] E-mail: yuber@ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

A functional (dihydroxybutyl) derivative of *p*-(2-benzoxazolyl)tolane, a fluorescent label novel for biopolymers, was synthesized. The functionalized solid support obtained on its basis was employed in the synthesis of oligodeoxynucleotides 3-terminally labeled with benzoxazolyltolane (these oligonucleotides also contained 1-phenylethynylpyrene residues). This fluorophore within its dihydroxybutyl derivative and the oligonucleotides modified with it displays an intensive fluorescence characterized by a high Stokes shift. The oligonucleotides labeled with this fluorophore are potential probes sensitive to the biopolymer microenvironment. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: modified nucleosides, modified oligodeoxynucleotides, *p*-(2-benzoxazolyl)tolane, 1-phenylethynylpyrene