

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Российской академии наук

На правах рукописи

Лисицына Екатерина Сергеевна

**ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ КРАСИТЕЛЕЙ С ДНК И ИХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА**

02.00.04 – физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель: Доктор химических наук,
профессор
Кузьмин Владимир Александрович

Москва-2014

Содержание

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	10
1.1 Типы взаимодействия различных лигандов с ДНК	10
1.1.1 Соединения, интеркалирующие между парами оснований ДНК	10
1.1.2 Соединения, локализующиеся при связывании в узкой бороздке ДНК	12
1.1.3 Соединения, локализующиеся при связывании в широкой бороздке ДНК	13
1.1.4 Соединения, ковалентно связывающиеся с ДНК.....	14
1.2 Катионные порфирины	14
1.2.1 Взаимодействие порфиринов с ДНК	15
1.3 Цианиновые красители	21
1.3.1 Взаимодействие цианиновых красителей с ДНК	23
1.3.2 Агрегация цианиновых красителей на матрице ДНК.....	24
1.3.3 SYBRGreen I.....	25
1.4 Круговой дихроизм молекулярно организованных структур ДНК – метод определения типа комплекса, образующегося между лигандом и ДНК	27
1.4.1 Упорядочение низкомолекулярных двухцепочечных ДНК	27
1.4.2 Круговой дихроизм дисперсий нуклеиновых кислот	29
1.5 Наночастицы золота	32
1.5.1 Фотофизические свойства наночастиц золота.....	33
1.5.2 Взаимодействие наночастиц золота с ДНК	34
1.5.3 Взаимодействие наночастиц золота с флуорофорами	35
Глава 2. Материалы и методы	41
2.1 Материалы	41
2.1.1 Катионные производные тетрафенилпорфиринов	41
2.1.2 Цианиновые красители	41
2.1.3 Наночастицы золота	42

2.1.4 Препараты ДНК	42
2.2 Методы.....	43
2.2.1 Спектрофотометрия и спектрофлуориметрия.....	43
2.2.2 Анизотропия флуоресценции	44
2.2.3 Метод однофотонного счета.....	45
2.2.4 Круговой дихроизм	46
Глава 3. Комплексообразование катионных тетрафенилпорфиринов с ДНК	47
3.1 Спектрофотометрическое исследование взаимодействия катионных производных тетрафенилпорфиринов с ДНК.....	47
3.2 Исследование взаимодействия производных катионных тетрафенилпорфиринов с ДНК методом кругового дихроизма.....	53
3.3 Определение типа комплекса, образуемого тетрафенилпорфиринами с ДНК в составе холестерической жидкокристаллической дисперсии, по спектрам кругового дихроизма.....	56
3.4 Времена жизни флуоресценции комплексов производных тетрафенилпорфиринов с молекулами ДНК	63
Глава 4. Исследование комплексов красителя цианинового ряда SYBRGreen I с ДНК	70
4.1 Концентрационное тушение красителя SYBRGreen I в комплексе с ДНК в растворе и в составе жидкокристаллических дисперсий ДНК	70
4.2 Деполяризация флуоресценции красителя SYBRGreen I – доказательство миграции энергии между мономерами красителя, интеркалированными в ДНК.....	73
4.3 Анализ времен жизни флуоресценции красителя SYBRGreen I при концентрационном тушении в присутствии ДНК в растворе и в составе упорядоченных структур жидкокристаллических дисперсий	74
4.4 Исследование комплексообразования красителя SYBRGreen I с ДНК в составе холестерической жидкокристаллической дисперсии методом кругового дихроизма	78

4.5 Исследование образования ассоциатов красителя SYBRGreen I на матрице ДНК методом спектрофотометрии	80
Глава 5. Взаимодействие наночастиц золота с комплексами красителя SYBRGreen I и ДНК.....	84
5.1 Тушение флуоресценции органических красителей наночастицами золота на матрице ДНК.....	84
5.2 Супертушение флуоресценции красителя SYBRGreen I наночастицами золота на матрице ДНК в растворе.....	87
5.2.1 Модели взаимодействия красителя SYBRGreen I с наночастицами золота на матрице ДНК в растворе	88
5.2.2 Механизмы тушения флуоресценции красителя SYBRGreen I наночастицами золота на матрице ДНК	94
5.2.3 Анализ кинетических кривых уменьшения флуоресценции красителя SYBRGreen I в комплексе с ДНК в растворе под действием наночастиц золота.....	96
5.2.4 Образование ассоциатов наночастиц золота в присутствии комплекса красителя SYBRGreen I с ДНК	98
Выводы	101
Список литературы	102

Введение

Механизмы фотохимических процессов с участием молекул красителей и родственных гетероциклических соединений, а также наночастиц различных благородных металлов интенсивно исследуются как с позиций фундаментальной науки, так и с точки зрения практического использования при разработке новых фотохимических методов в фотобиохимии, фотомедицине. В настоящее время сформировалось отдельное и весьма разветвленное направление исследования взаимодействий с ДНК различных низкомолекулярных лигандов (красителей, антибиотиков, коротких пептидов и других биологически активных соединений) и металлических наночастиц (наночастицы золота, серебра, платины и т. д.). Эти лиганды и наночастицы являются не только объектами самостоятельного изучения, но и нашли широкое применение в противоопухолевой и противовирусной терапии, а также в качестве ДНК-специфичных молекулярных зондов в различных исследованиях. Таким образом, изучение комплексообразования красителей с биомакромолекулами, в частности с ДНК, является актуальным.

Флуорофоры на основе производных порфиринов играют важную роль в различных фотохимических и фотобиологических процессах и являются перспективными объектами для конструирования фотохимических и фотобиологических сенсоров. Отмечается повышенное внимание исследователей к катионным производным порфиринов, которые в отличие от своих нейтральных или анионных аналогов обладают при облучении выраженным антимикробным действием. Интерес к катионным производным порфиринов по отношению к ДНК обусловлен также их потенциальным применением в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ), а, следовательно, возможностью связывания с ДНК при локализации ФС в ядре клетки. Таким образом, анализ комплексообразования данных лигандов с ДНК позволяет подобрать наиболее перспективный ФС для дальнейших фотодинамических исследований.

Потенциальные биологические и биомедицинские применения цианиновых красителей в качестве молекулярных зондов представляют особый интерес для исследователей. Цианиновые красители широко применяются в качестве флуоресцентных зондов для детекции ДНК и определения ее концентрации в биологических объектах. В частности, представители данного класса красителей с успехом применяются в экспериментах проточной цитометрии и методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Выбранный для исследования в данной работе цианиновый краситель SYBRGreen (SG) отличается высоким квантовым выходом флуоресценции в комплексе с ДНК по сравнению с выходом красителя в растворе, что обуславливает увеличение флуоресценции красителя при комплексообразовании с ДНК в > 1000 раз. Это свойство позволяет рассматривать краситель SG как весьма перспективный флуоресцентный зонд. Однако для красителей цианинового ряда характерен эффект самотушения при повышенных концентрациях, что может привести к некорректным результатам флуоресцентного анализа. Следовательно, исследование процессов самотушения красителя в комплексе с биомакромолекулами является одним из необходимых условий для применения флуоресцентного зонда. Процессы концентрационного самотушения красителей могут также иметь полезное практическое значение, которое состоит в применении красителя в качестве флуоресцентного детектора процессов конденсации-деконденсации биомакромолекул.

Исследование различных характеристик наноразмерных частиц (НЧ) золота давно привлекает внимание исследователей, поскольку НЧ золота обладают уникальными свойствами – оптическими, магнитными, электронными и химическими, которые могут быть использованы в дальнейшем для различных биохимических и биомедицинских применений. Системы флуорофор-тушитель, включающие НЧ благородных металлов в качестве тушителя и молекулы органического красителя, выступающие в качестве флуоресцентных меток, получили большое распространение в биофотонике в последнее время. Способность золотых НЧ эффективно тушить флуоресценцию и

биоломинесценцию находящихся рядом органических флуорофоров может применяться при разработке аналитических методов на основе флуориметрии. Поскольку подобные сенсорные системы можно использовать для качественного и количественного определения биомакромолекул, в частности, ДНК, важным является изучение природы взаимодействий в тройных системах краситель/ДНК/НЧ золота. Подобные знания могут помочь в создании более чувствительных и/или более селективных методов анализа ДНК *in vitro*, а в перспективе и *in vivo*.

Целью настоящей работы является изучение взаимосвязи структуры красителей, типа их комплексообразования с ДНК и спектрально-кинетических характеристик таких комплексов, а также исследование природы взаимодействий в тройных системах краситель/ДНК/НЧ золота методом спектрофлуориметрии и другими оптическими методами.

Основные задачи исследования:

- изучить влияние размера заместителей и наличия координированного металла в ядре тетрафенилпорфиринов на спектрально-кинетические характеристики их комплексов с ДНК;
- исследовать процессы самотушения флуоресценции красителя SYBRGreen в системах на основе ДНК с различной степенью молекулярной организации и выяснить механизм данного явления;
- изучить процесс комплексообразования в тройной системе, включающей краситель SYBRGreen, ДНК и наночастицы золота;
- определить спектрально-кинетические характеристики тройных систем на основе комплексов красителя SYBRGreen и молекул ДНК и наночастиц золота.

Научная новизна. Впервые проведено исследование комплексообразования новых синтетических катионных тетрафенилпорфириновых красителей с дц-ДНК, определены эффективные константы комплексообразования и установлена способность ТФП образовывать

два типа комплексов с нуклеиновой кислотой (интеркаляционный и внешний, в малой бороздке). Установлена корреляция между структурой тетрафенилпорфиринов и их способностью связываться с ДНК, а также характером их связывания с ДНК. Впервые обнаружен эффект самотушения красителя SG в молекулярно-организованных структурах на основе ДНК. Доказано, что резонансный перенос энергии (hetero-FRET) с возбужденного состояния красителя на нефлуоресцирующий ассоциат красителя лежит в основе эффекта самотушения флуоресценции. Обнаружен эффект «супертушения» флуоресценции SG наноразмерными золотыми частицами ($d \sim 2,5$ нм) на матрице ДНК, и впервые установлен механизм этого явления. Показано, что ключевым фактором в механизме этого эффекта является статическое тушение за счёт кооперативного связывания НЧ золота с красителем. Кооперативный характер связывания НЧ золота с красителем SG, интеркалированным в ДНК, с образованием нефлуоресцирующего комплекса обуславливает явление «супертушения» флуоресценции небольших мономерных флуорофоров наночастицами золота, природа которого до настоящего времени оставалась малоизученной.

Практическая значимость. Установленная в настоящей работе корреляция структуры катионных тетрафенилпорфиринов и их способности к комплексообразованию с ДНК представляет критерий отбора наиболее перспективных лигандов для последующих исследований на предмет фотодинамической активности. Данные, представленные в настоящей работе, раскрывают характер процессов самотушения красителя SG в различных системах на основе ДНК, накладывающих ограничения на его применение в качестве флуоресцентного зонда для детекции упорядоченных форм ДНК в биологических объектах. Таким образом, для корректного применения красителя во флуоресцентном анализе необходимо учитывать вклад процессов самотушения. С другой стороны, обнаруженный эффект концентрационного самотушения красителя SG позволяет применять его в качестве зонда для

наблюдения за процессами конденсации-деконденсации ДНК, в том числе, в экспериментах с живыми клетками. Обнаружение эффекта супертушения флуоресценции красителя SG под действием наночастиц золота в водном растворе ДНК может стать основой для разработки высокочувствительных сенсоров, работающих на принципе тушения флуоресценции. Установленный механизм супертушения открывает возможность управлять работой такой сенсорной системы, а также подбирать оптимальные варианты флуорофоров и тушителей для этих целей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Увеличение стерических затруднений в молекуле порфирина (удлинение метиленового спейсера и введение металла) препятствует комплексообразованию красителя с ДНК и приводит к преобладанию менее прочного типа комплекса залегания по малой бороздке ДНК над более стабильным интеркаляционным типом комплекса.
2. При высоких уровнях заполнения ДНК красителем SG в дополнение к интеркаляционному комплексу происходит образование ассоциата красителя в малой бороздке ДНК.
3. В упорядоченных системах на основе ДНК осуществляется эффект самотушения флуоресценции красителя SG по механизму резонансного переноса энергии (hetero-FRET) с возбужденного состояния красителя на нефлуоресцирующий ассоциат красителя.
4. Эффект супертушения флуоресценции красителя SG под действием НЧ золота в растворе ДНК обусловлен, главным образом, статическим тушением за счёт кооперативного связывания НЧ золота с SG, интеркалированным в ДНК, с образованием нефлуоресцирующего комплекса ДНК/SG/Au₃.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Типы взаимодействия различных лигандов с ДНК

Взаимодействие различных лигандов с ДНК может осуществляться как за счет образования ковалентных связей (например, в случае антибиотика сибиромицина), так и благодаря нековалентным взаимодействиям молекул, например, за счет водородных связей (в случае нетропсина, дистамицина А, беренила и других), стабилизироваться за счет электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. В комплексе лиганда с ДНК в образовании водородных связей могут принимать участие потенциальные донорные и акцепторные группы, как пар оснований, так и самого лиганда.

1.1.1 Соединения, интеркалирующие между парами оснований ДНК

В настоящее время хорошо известно, что многие вещества, в том числе некоторые важные химиотерапевтические соединения, связываются с ДНК в соответствии с моделью интеркаляции, согласно которой плоские хромофорные фрагменты молекул лигандов располагаются между соседними парами оснований двойной спирали. При связывании важную роль играют заместители, располагаясь, как правило, в узкой бороздке ДНК, они обеспечивают дополнительную стабилизацию комплекса за счет образования водородных связей между протон-донорными и протон-акцепторными группами лиганда и нуклеиновых оснований, а также за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных атомов заместителей с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Кроме того, современные исследования структуры комплексов лиганд-ДНК с помощью методов рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле показали, что по мере усложнения структуры заместителей возрастает способность лигандов связываться преимущественно с определенными последовательностями ДНК. Такое сродство к определенным последовательностям ДНК называют сиквенс-специфичностью.

Итак, согласно модели интеркаляции молекула встраивается (интеркалирует) между соседними парами оснований двойной спирали. Пары оснований, раздвигаясь, освобождают место молекуле лиганда и остаются перпендикулярными оси спирали. При этом молекула находится в ван-дер-ваальсовом контакте с парами оснований и, соответственно, параллельна им. Константы комплексообразования интеркаляторов с ДНК составляют обычно $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$. Как правило, для интеркаляторов характерна либо слабая GC-специфичность, либо вообще отсутствие специфичности [1]. Типичными интеркаляторами являются акридиновый оранжевый [2], профлавин [3], бромистый этидий [2].

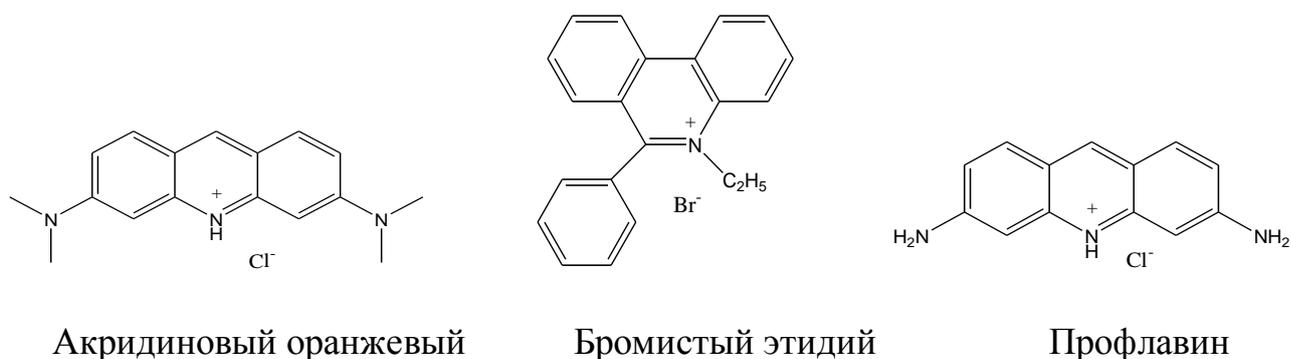


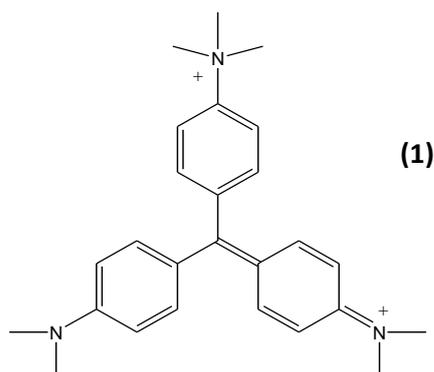
Рисунок. 1.1. Типичные интеркаляторы.

Известны также способы интеркаляции с локализацией части молекулы в бороздках ДНК, как например, интеркаляция со стороны узкой бороздки ДНК (Актиномицин Д), интеркаляция со стороны широкой бороздки ДНК (меногарил). Существуют, кроме того, вещества бис-интеркаляторы (эхиномицин, триостин А) и трис-интеркаляторы (акридиновые тримеры).

Следует отметить, что такие хорошо известные интеркаляторы как профлавин, акридиновый оранжевый, пиронин, метиленовый синий, бромистый этидий (см. **рисунок 1.1**) способны также локализоваться при связывании в узкой бороздке В-формы ДНК. Как правило, подобные соединения, ароматические фрагменты которых не обладают значительными боковыми группами, имеют слабую специфичность к определенным парам оснований. При низких концентрациях происходит образование комплекса по типу

интеркаляции, но по мере заполнения мест связывания при увеличении концентрации лиганда взаимодействие с ДНК происходит по типу внешнего присоединения с расположением в бороздках ДНК, преимущественно в узкой [4].

Существует ряд красителей, структура которых даже при наличии плоских ароматических фрагментов, препятствует интеркаляции, например, "метиловый зеленый" (1).

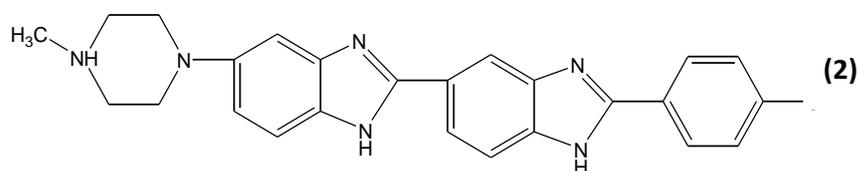


По стерическим причинам три бензольных цикла каждого из этих красителей не могут образовывать плоскую структуру, что, вероятно, препятствует интеркаляции лиганда между парами оснований ДНК. Эти соединения располагаются в узком желобе спирали ДНК [5]. В работе [6] авторы указывают на возможность локализации порфириновой части молекулы, в узкой бороздке с последующим расщеплением цепи ДНК.

1.1.2 Соединения, локализующиеся при связывании в узкой бороздке ДНК

Существует ряд соединений, которые связываются с нуклеиновой кислотой посредством залегания в узкой бороздке ДНК. Такими соединениями являются АТ-специфичные лиганды, содержащие пиррол-карбоксамидные (нетропсин, дистамицин А) [7], бензимидазольные (Хехст 33258 (2)) [8] и ариламидиновые фрагменты (DAPI, беренил, пентамидин) [9]. АТ-специфичность связывания подобных лигандов объясняется образованием водородных связей между молекулой лиганда и ДНК, отсутствием в АТ-содержащих участках 2-аминогрупп гуанина, являющихся стерическим препятствием для связывания молекул лиганда, а также наличием

отрицательного потенциала в узкой бороздке, обеспечивающего выигрыш в энергии взаимодействия при локализации в ней лиганда, который несет частичный положительный заряд.



Кроме того, известны GC-специфичные лиганды, например, митрамицин, хромомицин А₃, оливомоцин (производные ауреоловой кислоты). Данные соединения обладают противоопухолевой активностью, подавляя синтез РНК и ДНК. Производные ауреоловой кислоты, например, обладают специфичностью к GC-богатым последовательностям ДНК и для эффективного связывания с ДНК им необходимо присутствие ионов Mg(II). GC-специфичность, вероятно, обусловлена тем, что ОН-группы хромофоров могут образовывать водородные связи с NH₂-группами гуанинов в сайте связывания.

АТ-специфичные лиганды, такие как нетропсин, дистамицин А, Хехст 33258 и DAPI, могут связываться с ДНК посредством димерного «бок-о-бок» связывания в узкой бороздке ДНК [10]. Для дистамицина А было обнаружено, что сначала образуется комплекс со стехиометрией 1:1, т.е. связывается одна молекула лиганда с одним связывающим местом (связывающее место – участок ДНК, состоящий из нескольких пар оснований, физически накрываемых связанной молекулой со стороны узкой бороздки). При высоких концентрациях лиганда вторая молекула занимает тот же сайт связывания, образуется комплекс 2:1, но с гораздо меньшим сродством к ДНК.

1.1.3 Соединения, локализующиеся при связывании в широкой бороздке ДНК

Большинство низкомолекулярных соединений, для которых характерно связывание с ДНК посредством локализации в бороздках, обладают сродством именно к узкой бороздке. И лишь для немногих соединений есть данные об образовании комплекса в широкой бороздке ДНК. Такими лигандами, например,

являются «метиленовый синий» [11] и «метиловый зеленый» [12], а также антибиотик карцинофилин. Причем карцинофилин является бифункциональным алкилирующим агентом, образующим ковалентные сшивки между нитями ДНК со стороны широкой бороздки.

1.1.4 Соединения, ковалентно связывающиеся с ДНК

Данные соединения, локализуясь в одной из бороздок двойной спирали ДНК, могут образовывать ковалентные связи с основаниями ДНК. Примерами таких соединений являются антибиотики: митомицин С, антрамицин, сибиромидин, томаимицин (обладающие GC-специфичностью) и СС-1065, доукармицин А (обладающие AT-специфичностью). Связывание подобных лигандов с нуклеиновой кислотой осуществляется путем алкилирования ДНК [13].

1.2 Катионные порфирины

Повышенное внимание исследователей к катионным порфиринам, в отличие от нейтральных или анионных порфиринов, вызвано тем, что эти порфирины обладают выраженным антимикробным действием, которое напрямую зависит от их структуры [14]. Так положительный заряд способствует электростатическому притяжению порфирина к внешней поверхности клетки, где происходит основное взаимодействие [15]. Также благодаря своей уникальной структуре, фотофизическим и фотохимическим свойствам катионные порфирины используются в технике и технологии [16]. Таких свойств можно добиться включением различных функциональных групп в качестве заместителей порфиринового макроцикла.

Пример структуры катионных порфиринов представлен на **рисунке 1.2** [17].

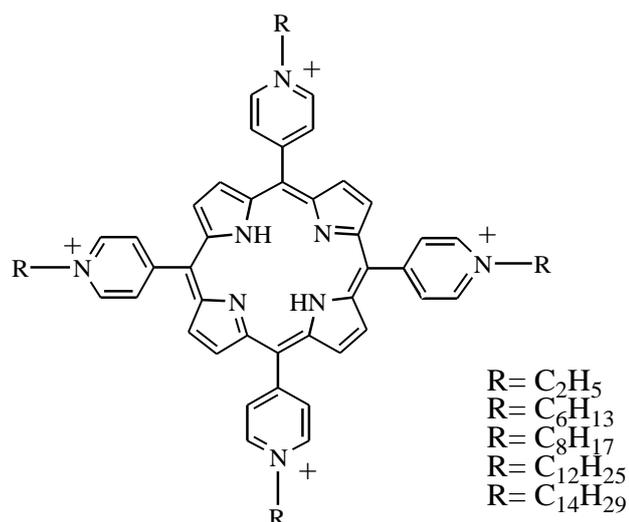


Рисунок 1.2. Структура 5,10,15,20-тетра-(4-пиридил)порфирина.

1.2.1 Взаимодействие порфиринов с ДНК

Взаимодействие порфиринов и металлопорфиринов с ДНК представляет значительный интерес с точки зрения медицинского применения. Их особые свойства: высокое оптическое поглощение, относительно высокие квантовые выходы триплетного состояния и флуоресценции или парамагнетизм некоторых металлокомплексов обеспечивают применение порфиринов в медицине в качестве активных соединений в радиологических [18] и магнитно-резонансных [19] методах диагностики рака.

Порфирины проявляют фотодинамическую активность по отношению к псориазу, атеросклеротическим бляшкам, вирусной и бактериальной инфекциям, включая также ВИЧ [20]. Катионные *мезо*-замещенные порфирины и их металлопроизводные доказали свою ценность при использовании их в качестве датчиков структуры нуклеиновых кислот и динамики их изменения. Было обнаружено, что порфирины способны взаимодействовать с Z-ДНК и превращать ее в B-форму. Были исследованы процессы переноса энергии с участием комплексов порфиринов с двойной спиралью ДНК. Также было отмечено, что некоторые производные порфиринов имеют нуклеазную активность, которая делает их незаменимыми агентами в экспериментах футпринтинга (метода определения участков нуклеиновых кислот, образующих комплексы с белками) [21].

Одним из важнейших применений порфириновых производных является фотодинамическая терапия (ФДТ) раковых заболеваний и бактериальных инфекций, в которой порфириновые аналоги выступают в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) [22]. Одним из механизмов данной терапии является взаимодействие ФС с ДНК при локализации в ядре клетки и фоторазрушение ДНК под действием света [23].

В отличие от лазерной хирургии, где энергия света используется в виде термического лазера, ФС, активированный светом, претерпевает химическое превращение, в результате которого появляется цитотоксичный агент, который впоследствии и уничтожает клетку. Идеальный сенсибилизатор должен хорошо локализовываться в или вокруг раковой опухоли, быть нетоксичным для нормальных тканей, возбуждаться светом, который может глубоко проникать в ткани, содержащие опухоль, быть фотохимически эффективным для производства цитотоксичных агентов [22]. Поскольку ни свет, ни сенсибилизатор отдельно не способны к образованию активных агентов, и нормальные и злокачественные ткани могут быть облучены вместе одним и тем же светом. В раковых клетках происходит накопление сенсибилизатора в концентрациях значительно больших, чем в здоровых клетках, поэтому фотооблучение одним и тем же светом должно рождать больше цитотоксичных агентов в раковых клетках.

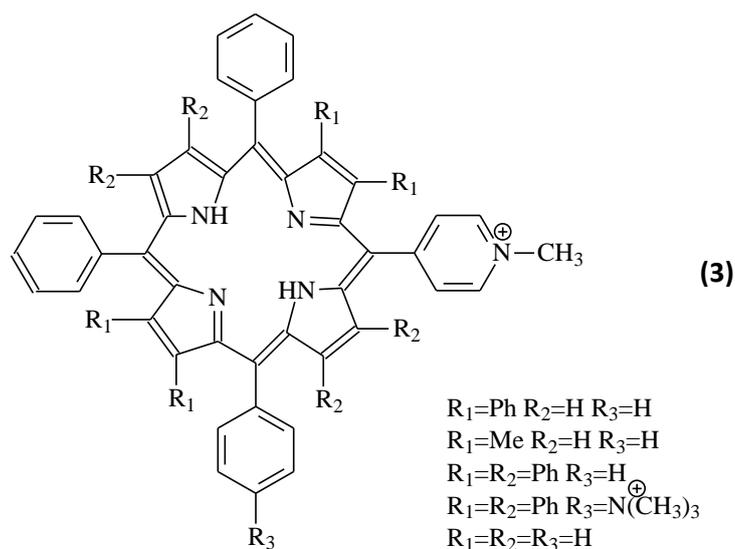
В частности, катионные порфирины рассматривают в качестве бифункциональных соединений, которые сильно связываются с ДНК и фотодинамически модифицируют прицельную область молекулы ДНК по механизму подобному механизму противораковых антибиотиков, таких как блеомицин и дауномицин, основанному на разрыве ДНК [24]. Взаимодействие катионных порфиринов с синтетическими и природными ДНК были широко исследованы с применением спектроскопии поглощения в видимой области, кругового дихроизма, флуоресценции, Раман-спектроскопии, ЯМР, ЭСР, вискозиметрии, футпринтинга, кинетических методов и рентгеноструктурной кристаллографии.

Существует ряд преимуществ исследования взаимодействий связывания ДНК с катионными порфиринами. Во-первых, данные молекулы связываются с нуклеиновыми кислотами способами подобными противораковым лекарственным средствам, т.е. интеркаляционным или внешним типами связывания. Это делает подобные порфирины яркими образцами взаимодействий лекарственное средство-ДНК, а также структуры ДНК. Во-вторых, их высокая растворимость и слабая склонность к агрегации в воде (за исключением очень высоких концентраций порфирина), делает их подходящими для исследований при широком многообразии условий раствора. В-третьих, посредством варьирования металлического центра и периферических заместителей тип связывания порфирина с дуплексами нуклеиновой кислоты может быть интеркаляционным или внешним (бороздочным). Например, квадратные, плоские Cu^{II} , Ni^{II} производные *мезо*-тетракис(*N*-метилпиридиний-4-ил)порфирина ($\text{H}_2\text{P}(2)$) способны к интеркаляции, так как данные металлопорфирины не связывают молекулы H_2O при их вакантных аксиальных областях и могут быть введены в карман между двумя соседними пространственно сближенными парами оснований [25].

Для связывания порфиринов с ДНК было предложено три основных модели связывания: интеркаляция, внешнее связывание по малой бороздке и внешнее связывание с самостэкингом, при котором порфирины выстраиваются вдоль спирали ДНК. В лаборатории Пастернака были установлены эмпирически достоверные критерии для различения интеркаляционного и внешнего типов связывания порфиринов с различными синтетическими и природными ДНК [26]. Исследование показало, что интеркалирующие порфирины характеризуются: (i) большим красным сдвигом ($\Delta\lambda \geq 15\text{nm}$) и гипохромными сдвигами ($\text{H} \geq 35\%$) их полосы *Sore*, (ii) отрицательной активностью индуцированного КД в полосе *Sore* и (iii) высокой селективностью к GC-обогащенным последовательностям ДНК. Напротив, внешнее связывание показывает: (i) намного меньшие красные сдвиги ($\Delta\lambda \leq 8\text{ nm}$) и небольшие гипохромные сдвиги ($\text{H} \leq 10\%$, а иногда гиперхромные) полосы *Sore*, (ii) положительную активность индуцированного

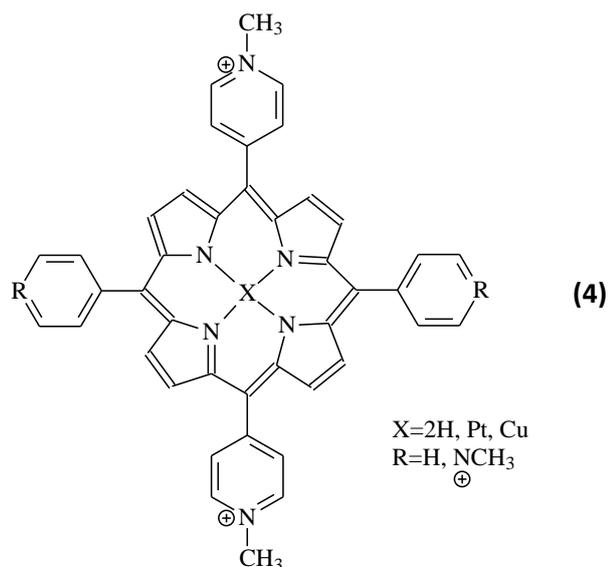
КД в области $Soret$ и (iii) ярко выраженное предпочтение к АТ-обогащенным сегментам малой бороздки. Взаимодействие порфиринов с ДНК тимуса теленка были изучены на основе их спектральных изменений полосы $Soret$ и индуцированного КД в видимой области, а также спектров флуоресценции и измерения вязкости. Было выяснено, что ТРурРР связывает ДНК посредством самостэкингового внешнего связывания и электростатического взаимодействия. Тогда как ТРурРР(Ni) имеет в центре Ni, который не связывает молекулы H_2O при их вакантных аксиальных областях, но он связывает ДНК посредством внешнего типа связывания и электростатического взаимодействия.

В работе [27] авторы исследовали порфирины (3). Способность соединений к фотоокислению и связыванию с ДНК проверяли методами УФ-спектроскопии, флуоресценции, кругового дихроизма и электрофореза.



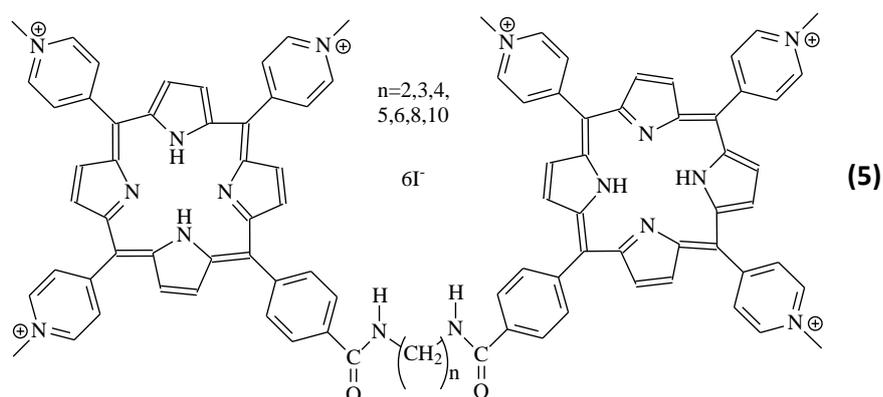
Было обнаружено, что замещение по β положениям порфирина существенно влияет на степень и характер взаимодействия с ДНК, при этом увеличение числа зарядов усиливает взаимодействие с ДНК.

В работе [28] были исследованы порфирины (4), которые предполагают применять в качестве реагентов для качественной реакции на однонитевую ДНК, благодаря уникальным спектроскопическим сигналам, которые возникают при связывании с ней.



Была отмечена зависимость, при которой платиновый тетракаationный комплекс связывался только с двухцепочечной ДНК, что приводило к батохромному сдвигу полосы $Sore$ на 18 нм, а для медного тетракаationного комплекса было характерно сильное устойчивое изменение спектра кругового дихроизма в области полосы $Sore$. Как заявляют авторы, именно медный тетракаationный комплекс порфирина (4), подходит для обнаружения однострессовой ДНК в сложной смеси различных нуклеиновых кислот.

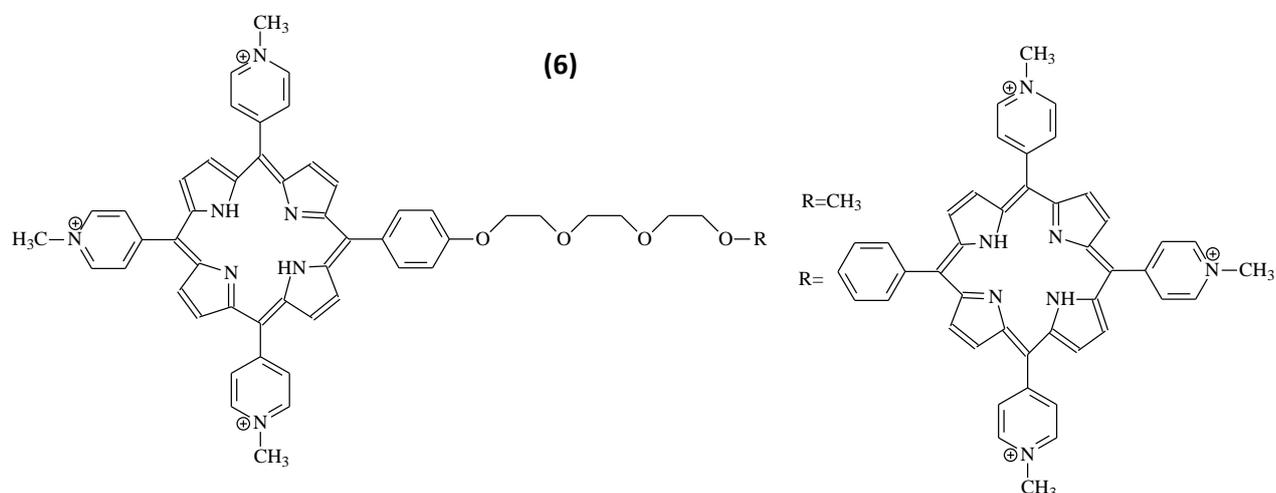
Авторов работы [29] привлекла серия катионных бис-порфиринов (5) с различной длиной диаминоалкильного спейсера.



Исследования показали, что при связывании с ДНК происходило изменение спектра кругового дихроизма в области полосы $Sore$, поэтому авторы предполагают, что связывание происходит по принципу внешней самоупаковки на поверхности ДНК. В ряду с увеличением длины диаминоалкильного спейсера

происходило уменьшение фотонуклеазной активности по отношению к ДНК, что соотносится с тенденцией к димеризации бис-порфиринов. Также в работе было показано, что азид анион N_3^- обладает ингибирующим эффектом для расщепления ДНК, а D_2O обладает стимулирующим эффектом, что дает возможность предположить, что в реакции фоторасщепления ДНК участвует синглетный кислород.

В работе [30] исследовали свойства трикатионного порфирина (6) с метильным заместителем на периферии и его димера, конъюгированного с гидрофильным триэтиленгликолем.



В ходе исследований, которые проводили с помощью поляризационной спектроскопии, спектроскопии поглощения было обнаружено, что при связывании с полинуклеотидами исследуемые порфирины вели себя так же, как и порфирин без периферических заместителей, из чего можно сделать вывод о том, что заместители на периферии пиридинового кольца не меняют характер связывания. При связывании димера порфирина (6) с поли[d(G-C)₂], отрицательный пик в спектрах КД и ЛД в области полосы Soret заменяется пиком с высотой гораздо меньше, чем при связывании с ДНК. После стабилизации комплекса через некоторое время интенсивность отрицательного пика КД и ЛД увеличилась. Такие изменения показывают, что первично связывается одна часть димера, а через несколько часов вторая [31].

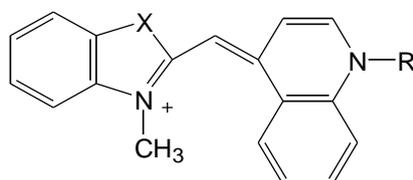
1.3 Цианиновые красители

Цианиновые красители (ЦК) представляют собой большой класс флуоресцентных красителей. Цианиновые хромофоры состоят из соответствующим образом кватернизованных гетероароматических систем, которые связаны между собой метиновым (полиметиновым) мостиком, при этом их максимумы поглощения и флуоресценции лежат в диапазоне от 500 до 750 нм или более [32, 33]. Цианиновые красители обычно обладают высокими квантовыми выходами флуоресценции (0,1 – 0,4 в этаноле), высокими коэффициентами экстинкции (достигающими или превышающими $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и умеренной фотостабильностью [32-34].

Первоначально цианиновые красители нашли свое применение в фотографии [35], а затем в высокоэнергетических лазерах и устройствах для хранения цифровых изображений. Однако наибольшее внимание привлекает биологическое и биомедицинское применение ЦК в качестве молекулярных зондов [36]. В настоящее время большинство флуоресцентных красителей, обычно применяемых для анализов визуализации ДНК, принадлежат цианиновому семейству, поскольку данные молекулы проявляют высокое сродство к двойной спирали нуклеиновой кислоты, сильное поглощение в видимом диапазоне спектра и резкое увеличение флуоресценции при взаимодействии с ДНК [37-41]. Основным применением данных красителей стало определение последовательности ДНК и применение во флуоресцентной микроскопии, но цианиновые красители также можно с пользой применять для конформационных исследований при помощи флуоресцентного переноса энергии [42, 43], для окрашивания в электрофорезе на агарозном геле и капиллярном электрофорезе [44], для анализа ДНК при помощи ПЦР [45, 46], и в проточной цитометрии [47], или в качестве флуоресцентных зондов в исследовании текучести мембран [48] и в исследованиях потенциала мембран [49].

В работе [50] описаны цианиновые красители оксазоловый желтый (YO) и тиазоловый оранжевый (TO), представленные на **рисунке 1.3**. Благодаря

превосходным фотофизическим свойствам и высокому сродству к ДНК флуоресцентные ЦК применяют для детекции ДНК в различных методиках, таких как ПЦР [45, 51], определение размеров фрагментов рестрикции [52] и проточная цитометрия [47].



TO-PRO-1: X = S, R = -CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₃⁺

TO: X = S, R = -CH₃

YO-PRO-1: X = O, R = -CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₃⁺

Рисунок 1.3. Общие химические структуры мономерных хинолиновых цианиновых красителей.

Одним из двух типов взаимодействия ЦК с ДНК является интеркаляция между парами оснований, которая является предпочтительной при низких концентрациях красителя сравнимых с концентрацией пар оснований ДНК. Ограниченное вращение относительно мостиковой связи между ароматическими кольцами цианинового красителя (при интеркаляции в ДНК) объясняет существенное различие в спектрах поглощения и флуоресценции связанной и несвязанной формы красителя, которое в свою очередь является основой для многочисленных методов визуализации нуклеиновых кислот [36, 53].

В работе [54] описаны диметинцианиновые красители (**рисунок 1.4**), которые также проявляют более высокие квантовые выходы флуоресценции в комплексе с биомолекулами, чем в несвязанной форме, и могут применяться в качестве флуоресцентных зондов.

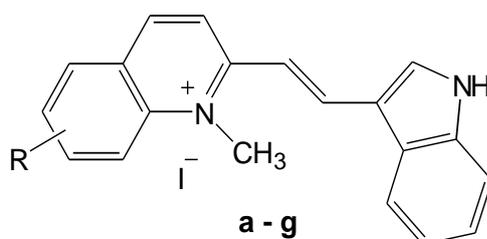


Рисунок 1.4. Диметинцианиновые красители, где R: a – H; b – 6-CH₃; c – 6-Cl; d – 6-Br; e – 7-CH₃; f – 7-Cl; g – 7-Br.

Еще одним подклассом цианиновых красителей, которые представляют интерес в качестве флуоресцентных зондов, являются димерные цианиновые красители, например, ТОТО и YOYO (рисунки 1.5). В работе [36] проведено сравнение данных димерных цианиновых красителей и их мономерных аналогов и установлено, что все они практически не флуоресцируют в растворе в отсутствие нуклеиновых кислот, тогда как в комплексе с ДНК красители ТОТО и YOYO обладают более высокими коэффициентами экстинкции ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) относительно мономерных ЦК ТО и YO ($7,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Таким образом, при комплексообразовании данных красителей с ДНК квантовый выход флуоресценции резко возрастает, благодаря чему сильно увеличивается чувствительность флуоресцентного метода определения. Дополнительным преимуществом димерных ЦК ТОТО и YOYO является способность образовывать комплексы с ДНК, которые будут устойчивы в условиях электрофореза на агарозном или акриламидном гелях, которой мономерные ЦК ТО и YO не обладают.

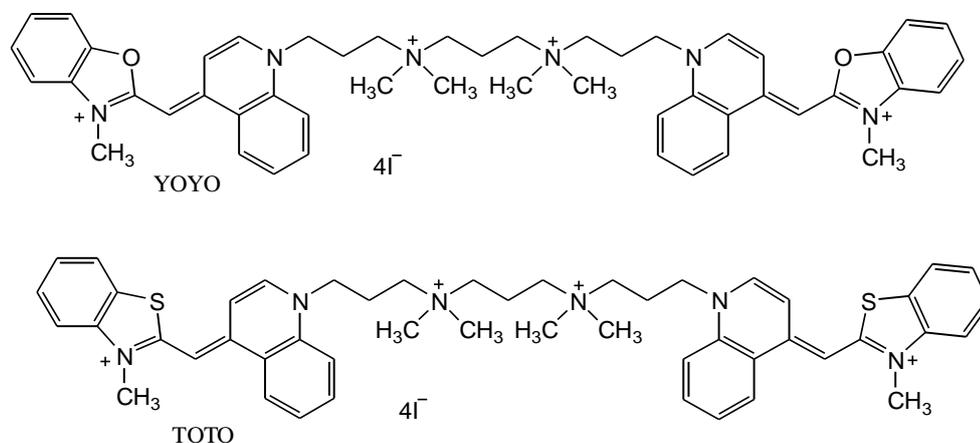


Рисунок 1.5. Формулы димерных цианиновых красителей ТОТО и YOYO.

1.3.1 Взаимодействие цианиновых красителей с ДНК

Цианиновые красители могут взаимодействовать с ДНК по механизму интеркаляции, а также по механизму связывания с бороздкой ДНК [55-57]. Eriksson и сотрудники [57] проводили исследование скоростей диссоциации как неинтеркалирующих, так и интеркалирующих ЦК, исходя из утверждения, что красители, связывающиеся по малой бороздке, более чувствительны к солям, чем

интеркаляторы с таким же зарядом. Авторы предположили, что по анализу эффекта солей можно было бы различать два типа связывания.

Цианиновые красители могут также взаимодействовать между собой при высоких уровнях заполнения ДНК, а также в конденсированных структурах ДНК, когда расстояние между ними сокращается и становится подходящим для осуществления переноса энергии по механизму homo-FRET. В этом случае в качестве донора и акцептора выступают молекулы одного и того же соединения, что является возможным, если соединение имеет небольшой стоксов сдвиг спектра флуоресценции относительно спектра возбуждения, таким образом, имеет место хорошее перекрывание данных спектров (условие резонанса) [58].

1.3.2 Агрегация цианиновых красителей на матрице ДНК

Известно, что цианиновые красители могут не только взаимодействовать с ДНК в виде мономера и, соответственно, применяться в качестве флуоресцентного зонда для определения биомолекулы, но некоторые цианиновые красители могут также образовывать димеры и спирально закрученные агрегаты, для которых матрицей служит молекула дц-ДНК. Схематическое изображение структуры H- и J-агрегатов, которые могут образовываться в малой бороздке ДНК, представлено на **рисунке 1.6** [59].

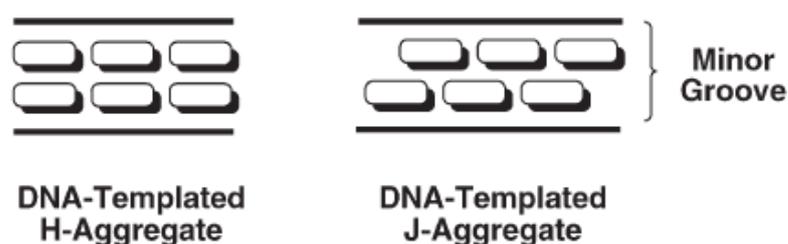


Рисунок 1.6. Иллюстрация H- и J-агрегации в узкой бороздке ДНК [59].

В работе [60] авторы обнаружили способность цианиновых красителей ($\text{DiSC}_{3+}(5)$) образовывать сразу два типа агрегатов (H- и J-типы) при взаимодействии с ДНК. Образование агрегатов сопровождалось появлением в спектрах поглощения двух полос, одна из которых в области более коротких волн (H-тип) по сравнению с поглощением мономера, вторая в области более длинных волн (J-тип). Данные полосы обусловлены стэкинг-взаимодействиями

между красителями, составляющими димеры. Кроме того, авторы показали, что ширина агрегатов ограничивается шириной малой бороздки ДНК, тогда как длина агрегатов может быть значительной и простирается на всю длину молекулы двухцепочечной ДНК. В другой работе сообщается, что аналогичный цианиновый краситель с нейтральным зарядом молекулы ($\text{DiSC}_2(5)$) образует только спирально закрученный H-агрегат на матрице ДНК [61].

Еще один краситель цианинового ряда YOYO-1 может образовывать H-димеры или агрегаты в малой бороздке ДНК при достаточно высоких концентрациях красителя. Это свойство красителя лежит в основе его применения в качестве флуоресцентного детектора конденсации молекул ДНК. Агрегация красителя приводит к резкому уменьшению квантового выхода флуоресценции YOYO-1 в результате самотушения красителя, которое обусловлено резонансным переносом энергии на нефлуоресцирующие H-димеры. Однако в неконденсированной форме ДНК расстояние между красителем в мономерной и агрегированной формах, по-видимому, не достаточно для осуществления переноса энергии [62].

Таким, образом, димеризация и агрегация в малой бороздке ДНК является распространенным явлением среди цианиновых красителей, и в большой степени определяется структурой и зарядом молекул красителей.

1.3.3 SYBRGreen I

Цианиновый краситель SYBRGreen (SG) обладает уникальными свойствами, одним из которых является достаточно высокий коэффициент поглощения ($\sim 7,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ в TE буфере, pH 7,5). Кроме того, SG имеет высокий квантовый выход флуоресценции в комплексе с дц-ДНК по сравнению с практически отсутствующей флуоресценцией в водных растворах. Эти свойства обусловили широкое применение красителя SG для обнаружения и количественного флуоресцентного анализа двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот в различных биохимических жидкостях различными

методами, такими как флуоресцентные методы визуализации, ПЦР, проточная цитометрия и тому подобное [63-67].

Максимум поглощения SG наблюдается при 494 нм в несвязанном состоянии и батохромно сдвигается до 497 нм при комплексообразовании с дц-ДНК. Кроме того, в спектре красителя имеются два небольших дополнительных максимума поглощения – при 290 нм и 380 нм. Максимум флуоресценции красителя, связанного с ДНК, соответствует длине волны 520 нм [63].

Структура красителя

В работе [63] определены структуры цианиновых красителей SYBRGreen (SG) и PicoGreen (PG) при помощи масс-спектрометрии. Эти два красителя имеют одинаковую структуру ядра, состоящую из бензтиазоловой и хинолиновой частей, связанных метиновым мостиком, и различаются одним заместителем в положении 2 хинолина. SG имеет N-(3-диметиламинопропил)-N-пропиламиногруппу, а PG – N-бис-(3-диметиламинопропил)-N-пропиламиногруппу (рисунок 1.7).

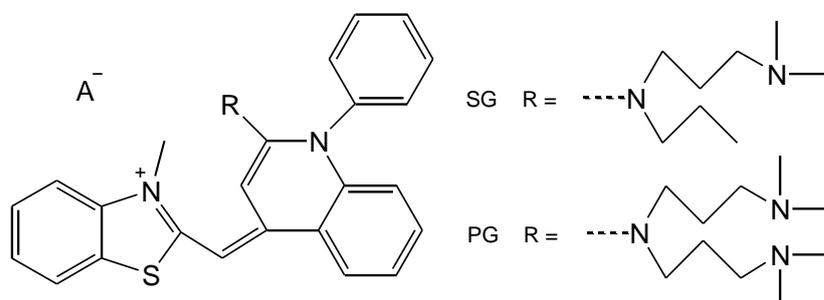


Рисунок 1.7. Химическая структура красителей SYBRGreen (SG) и PicoGreen (PG).

На основании структурных формул красителей был сделан вывод о том, что краситель SG несет два положительных заряда в стандартных условиях, тогда как PG имеет три положительных заряда. Один положительный заряд обусловлен распределением электронной плотности между сопряженными гетероциклическими группами, связанными метиновым мостиком. Один или два дополнительных заряда в SG и PG, соответственно, образуются в результате протонирования аминогрупп 3-диметиламинопропиловых остатков.

Положительные заряды, очевидно, способствуют эффективному связыванию красителей с дц-ДНК.

Связывание SYBRGreen I с двухцепочечной ДНК

В работе [64] авторы обнаружили, что краситель SG образует прочный комплекс с дц-ДНК в буферном растворе с равновесной константой комплексообразования $K_a = 3,2 \pm 0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Было также показано, что прочность взаимодействия уменьшается по мере увеличения концентрации NaCl в растворе, а, соответственно, большой вклад в энергию взаимодействия вносит энергия электростатического взаимодействия. В той же работе авторы заявляют, что SG образует с ДНК более одного типа комплексов, а именно интеркаляционный при низких концентрациях красителя, внешние типы комплексов (электростатический и с малой бороздкой ДНК). Кроме того, было показано, что ароматическая сопряженная система из бензотиазола и хинолина интеркалирует между основаниями ДНК, тогда как диметиламинопропиловая и пропиловая цепи располагаются в малой бороздке ДНК. Такое расположение красителя и определяет размер сайта связывания 3,5 пары оснований, который был посчитан из зависимости МакГи – фон Хиппеля.

Другие авторы выявили, что SG проявляет АТ-специфичность при относительно высоких соотношениях краситель/ДНК [63]. Те же авторы обнаружили, что SG также эффективно связывается с одноцепочечными ДНК (оц-ДНК), однако интенсивности флуоресценции при таком взаимодействии гораздо ниже, что имеет большое значения для применения красителя в ПЦР анализе.

1.4 Круговой дихроизм молекулярно организованных структур ДНК – метод определения типа комплекса, образующегося между лигандом и ДНК

1.4.1 Упорядочение низкомолекулярных двухцепочечных ДНК

Одним из способов конденсации двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот (НК) является способ «энтропийной конденсации», т.е. процесс, который реализуется при фазовом «исключении» молекул НК из водно-солевых

растворов при добавлении к ним некоторых водорастворимых полимеров, в частности полиэтиленгликоля (ПЭГ) (расстояние между молекулами ДНК в квазинематическом слое зависит от осмотического давления растворителя). В результате этого процесса, при соблюдении определенных условий, создаваемых при высокой концентрации добавляемого полимера, молекулы НК низкой молекулярной массы упорядочиваются и образуют частицы жидкокристаллических дисперсий ДНК (жкд-ДНК). Размер частицы жкд-ДНК, оцениваемый теоретически, близок к 500 нм; в состав частицы входит около 10^4 молекул НК.

Для частиц, формируемых из двухцепочечных молекул НК таким способом конденсации, является характерным то, что полимер не входит в состав образующихся частиц дисперсии. Кроме того, для таких частиц жкд-ДНК характерна высокая (в пределах от 160 до 600 мг/мл) локальная концентрация НК. Расстояние d между соседними молекулами НК в частицах можно регулировать в пределах 2,5–5,0 нм, меняя осмотическое давление раствора. Молекулы НК, в силу присущей им геометрической и оптической анизотропии, образуют, в основном, холестерические жкд-ДНК (хжкд-ДНК), характеристикой которых является наличие аномальной полосы в спектре КД в области поглощения хромофоров (азотистых оснований) НК. Упаковка молекул НК в частицах хжкд-ДНК имеет не только упорядоченный, но и «жидкостной» характер, поскольку молекулы НК в каждом квазинематическом слое способны как вращаться вокруг своей оси, так и испытывать латеральное смещение. В силу жидкостного характера упаковки молекул НК в квазинематических слоях различные соединения могут легко диффундировать внутрь частиц хжкд-ДНК. Таким образом, для образующихся частиц дисперсии НК характерны как свойства кристаллических тел, так и свойства жидкостей [68].

1.4.2 Круговой дихроизм дисперсий нуклеиновых кислот

Круговой дихроизм является методом, доказывающим холестерическую упаковку молекул нуклеиновых кислот в частицах дисперсий, а также методом анализа их свойств.

Форма полосы в спектре КД фазы ДНК аналогична форме спектра поглощения, хотя максимум полосы в спектре КД заметно смещен в область больших длин волн ($\lambda \sim 300$ нм). Сопоставление кривых 1 и 2 на **рисунке 1.8** показывает, что образование холестерической фазы ДНК сопровождается появлением интенсивной полосы в спектре КД [68]. Эта полоса имеет отрицательный знак и расположена в области поглощения азотистых оснований ДНК. Оцениваемая для этой полосы величина молярного кругового дихроизма дисперсии ДНК $\Delta\epsilon$ во много раз превышает величину $\Delta\epsilon$ (около 2 ед.), которая отражает свойства изолированных «хромофоров» (азотистых оснований, поглощающих в УФ-области спектра) или азотистых оснований в составе исходных линейных молекул ДНК.

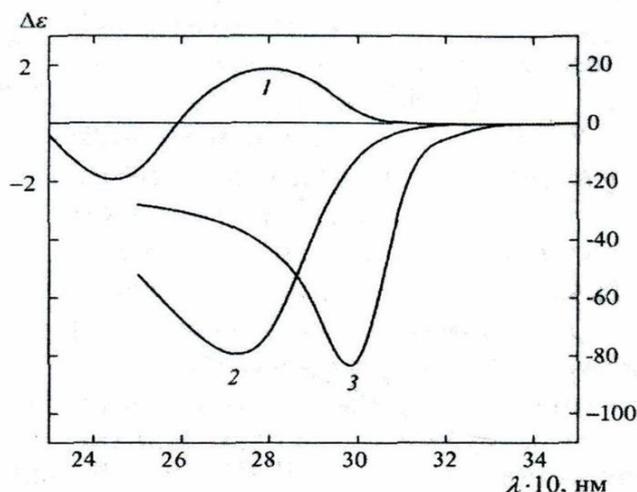


Рисунок 1.8. Спектры КД водно-солевого раствора В-формы ДНК (1), хжкд-ДНК (2) и тонкого слоя (20 мкм) жк-ДНК (3) [68].

Наличие аномальной полосы обусловлено коллективными эффектами, возникающими при прохождении света через холестерическую фазу, для которой характерна не только плотная спиральная упаковка соседних молекул ДНК, но и упорядоченное расположение поглощающих диполей этой макромолекулы.

Отрицательный знак полосы в спектре КД холестерической фазы означает, что соседние молекулы ДНК в этой фазе имеют левую закрутку. Такой вывод основан на следующем факте. Круговой дихроизм (КД) может быть описан при помощи уравнения **1.1**:

$$\text{КД} = A_L - A_R, \quad (1.1)$$

где A_L и A_R – поглощение лево- и правополяризованного света.

Интенсивность прошедшего света и поглощающая способность A связаны классическим законом Ламберта-Бера (уравнение **1.2**):

$$I = 10^{-A} \cdot I_0 \quad (1.2)$$

Например, если вдоль оси холестерика распространяется электромагнитная волна с правой круговой поляризацией, то мгновенное распределение направлений вектора напряженности электрического поля в ней образует левозакрученную спираль, в большей степени соответствующую направлениям поглощающих диполей перехода в молекуле, чем для левой круговой поляризации излучения. Следовательно, в таком случае для поглощающих элементов выполняется соотношение $A_R > A_L$, и круговой дихроизм имеет отрицательный знак [68].

Если частицы хжкд-ДНК сформированы из двухцепочечных молекул ДНК, которые связаны с соединением, жестко фиксированным по отношению к длинной оси этой молекулы («внешним хромофором», имеющим полосу поглощения, не совпадающую с полосой поглощения азотистых оснований ДНК), то в спектре КД появляются две аномальные полосы. При этом при малой концентрации «внешнего» хромофора, вводимого в структуру частиц хжкд-ДНК, упаковка молекул ДНК в частицах хжкд-ДНК не будет меняться. Такая ситуация возможна, в частности, при интеркаляции (встраивании) между парами оснований ДНК окрашенных биологически активных соединений, в частности антибиотиков антрациклинового ряда, которые взаимодействуют с молекулами ДНК, образуя частицы хжкд-ДНК. Поскольку все положения теории КД распространяются как на хромофоры ДНК, так и на «внешние» хромофоры,

вводимые в структуру частиц хжкд-ДНК, то в данном случае появляется две полосы, расположенные в разных областях спектра КД.

Совпадение знаков полос (**рисунок 1.9**, [68]) свидетельствует о том, что молекулы антибиотиков расположены по отношению к длинной оси молекулы ДНК точно так же, как расположены пары оснований, т.е. угол между плоскостью молекул «внешних хромофоров» и длинной осью молекулы ДНК близок к 90° . Такое совпадение знаков двух аномальных полос в спектрах частиц хжкд-ДНК, расположенных в разных областях спектра, возможно лишь в том случае, если молекулы «внешнего хромофора» встраиваются (интеркалируют) между парами азотистых оснований ДНК.

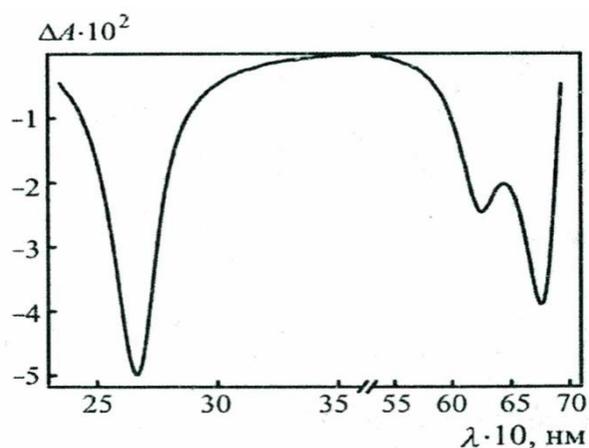


Рисунок 1.9. Теоретически рассчитанные спектры КД частиц хжкд-ДНК, обработанных митоксантроном [68].

Если «внешний хромофор» располагается на молекуле ДНК таким способом, при котором угол наклона плоскости его хромофора по отношению к длинной оси молекулы ДНК находится в пределах от 0 до 54° , интенсивная полоса в спектре КД в области поглощения этого хромофора будет иметь знак, противоположный знаку полосы, характерной для азотистых оснований ДНК, т.е. будет положительным [69].

Амплитуда аномальной полосы в спектрах КД хжкд-ДНК представляет собой простой легко детектируемый критерий, отражающий как формирование частиц жкд-ДНК из жестких двухцепочечных линейных молекул ДНК, так и изменение свойств жкд-ДНК при действии различных факторов на исходные молекулы ДНК и сформированные частицы хжкд-ДНК.

1.5 Наночастицы золота

Наноразмерные частицы (НЧ) золота привлекают внимание исследователей уже в течение нескольких десятков лет, поскольку НЧ золота обладают уникальными свойствами – электронными, химическими оптическими и магнитными, которые могут найти различные практические применения, например, для обнаружения биомолекул [70-73], доставки лекарственных препаратов [74-77], фототермической терапии опухолей [78-80], а также в нанолитографии [81] и катализе [82, 83].

Известны различные типы наноразмерных частиц золота, такие как сферические наночастицы, наностержни, оболочечные или частицы, состоящие из ядра и золотой оболочки, а также золотые наноклетки [84]. Свойства наноструктур на основе золота разных форм существенно различаются, как показано на **рисунке 1.10**.

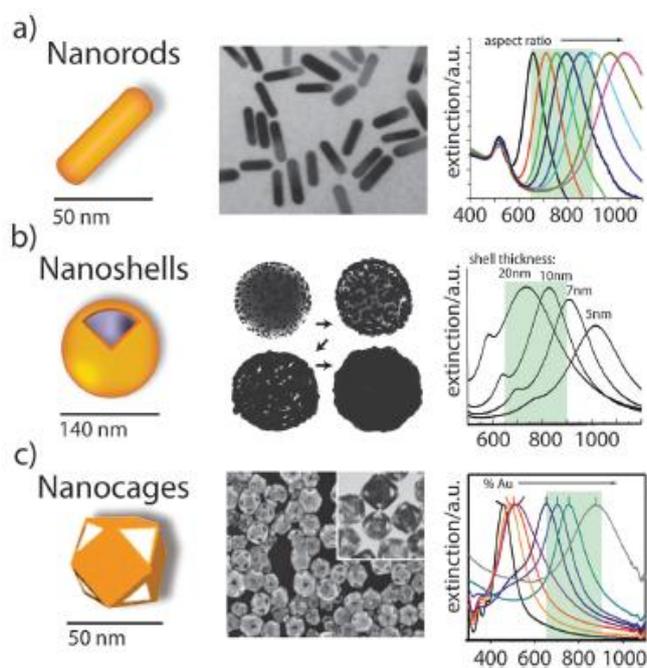


Рисунок 1.10. Типы золотых наноструктур: (а) наностержни; (б) оболочечные и (с) наноклетки. Батохромные сдвиги в спектрах поглощения выявлены при увеличении отношения длины к ширине, уменьшении толщины золотой оболочки, увеличении процента золота, соответственно. Зеленым цветом на спектрах отмечена спектральная ширина «окна прозрачности» биологических тканей. Взято из обзорной статьи [84].

Существует множество способов синтеза сферических наночастиц золота, большинство из которых основано на восстановлении коммерчески доступной золотохлористоводородной кислоты (HAuCl_4) различными способами, например цитратное восстановление Туркевича [85] или восстановление хлоридом тетрагидроксиметилфосфония в щелочной среде по Даффу [86]. Также известен метод Бруста-Шифрина, который представляет собой синтез в

двухфазных водно-органических средах с применением тиоловых лигандов для стабилизации частиц [87], и рост наночастиц, стимулируемый внесением «затравки» в раствор соли металла в присутствии мягкого восстановителя [88].

1.5.1 Фотофизические свойства наночастиц золота

При облучении светом наночастиц золота может происходить ряд процессов, таких как, поглощение света, рассеивание света с такой же частотой, как падающий свет, испускание поглощенного света (флуоресценция), усиление электромагнитного поля падающего на образец света, и, таким образом, усиление всех спектральных сигналов молекул, находящихся на поверхности НЧ золота [89].

Уникальным свойством наноразмерных частиц металлов является поверхностный плазмонный резонанс (ППР). Данное свойство проявляется под воздействием светового излучения на наночастицы, при котором электромагнитное поле света заставляет электроны проводимости когерентно осциллировать. При совпадении частоты внешнего поля и собственной частоты колебаний электронов наступает резонансный эффект. Данный эффект проявляется в спектре поглощения наличием полосы ППР. Ширина полосы плазмонного поглощения и положение ее максимума сильно зависят от размера частиц. Так для золотых наносфер со средним диаметром 20 нм резонансный эффект наступает в видимой области длин волн, $\lambda \sim 520$ нм, благодаря чему раствор коллоидных частиц золота имеет красный цвет [89, 90]. При увеличении размера частиц пик ППР уширяется и сдвигается в красную область спектра [91] (**рисунок 1.11**, [92]).

Полоса плазмонного резонанса также является очень чувствительным параметром к уменьшению расстояния между наночастицами в коллоидном растворе с образованием мелких агрегатов [93]. В результате агрегации цвет раствора меняется от красного до фиолетового, и этот эффект является основой колориметрического метода определения веществ [94-96].

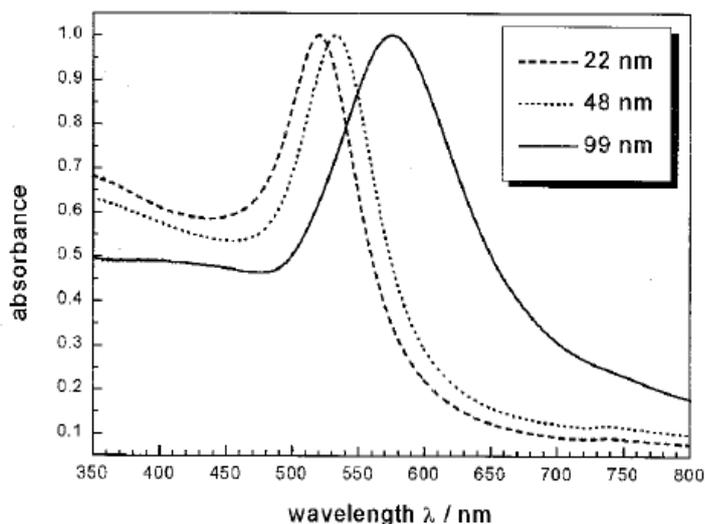


Рисунок 1.11. Спектры поглощения сферических наночастиц золота с диаметром 22, 48 и 99 нм. Полоса поглощения соответствует ППР [92].

Однако наночастицы золота небольшого диаметра < 3 нм проявляют полупроводниковые свойства, а не металлические, и не имеют отчетливой полосы ППР в спектре поглощения [97].

1.5.2 Взаимодействие наночастиц золота с ДНК

Возможность потенциального применения НЧ золота в медицине повлекла за собой необходимость исследовать их токсичность по отношению к клеточным компонентам, самым важным из которых является ДНК.

При связывании НЧ с биомолекулярной структурой важную роль играет поверхность частицы, так как на ее поверхности располагаются электрические заряды. Положительно или отрицательно заряженные поверхности могут вести себя по-разному. Например, в работе [96] представлен метод определения гибридизации олигонуклеотидов при помощи наночастиц золота. В основе данного метода лежит электростатическое взаимодействие НЧ золота ($d \sim 13$ нм) с ДНК, и различие электростатических свойств оц- и дц-ДНК.

Представляется важным изучение взаимодействия небольших НЧ золота размером 1–4 нм с ДНК, поскольку они сопоставимы по размерам с размером бороздок ДНК. Структурные исследования комплексов ДНК с НЧ выявили существование нескольких типов комплексообразования в зависимости от размера частиц по отношению к длине ДНК: адсорбция, намотка и агрегация [98]. Независимо от типа комплексообразования взаимодействие НЧ с ДНК приводит к обратимым конформационным изменениям структуры ДНК с

увеличением степени ее компактизации, что подтверждено методом КД и флуоресценции [98, 99]. Однако механизм процесса компактизации до сих пор не объяснен.

В работе [100] авторы провели кинетическое исследование взаимодействия ДНК и НЧ золота, стабилизированных N-(2-меркаптопропионил)глицином, в водных и водно-солевых растворах. Был предложен трехстадийный механизм взаимодействия НЧ с ДНК, в котором первая стадия соответствует очень быстрому процессу образования первичного комплекса. Вторая стадия включает образование более прочного комплекса за счет взаимодействия гидрофильных групп тиопропина и малой бороздки ДНК. Третья стадия была интерпретирована, как последовательное изменение конформации комплекса, образовавшегося на второй стадии, в более компактную структуру.

Другими авторами было заявлено, что маленькие НЧ золота ($d \sim 1,4$ нм) координируются в большой бороздке ДНК, которая хорошо соответствует по размеру данным кластерам золота [101]. В обзорной статье [102] подобное взаимодействие объясняется электростатическими взаимодействиями, а именно заменой монодентатных фосфиновых лигандов, стабилизирующих НЧ золота, полидентатными отрицательно заряженными группами бороздки.

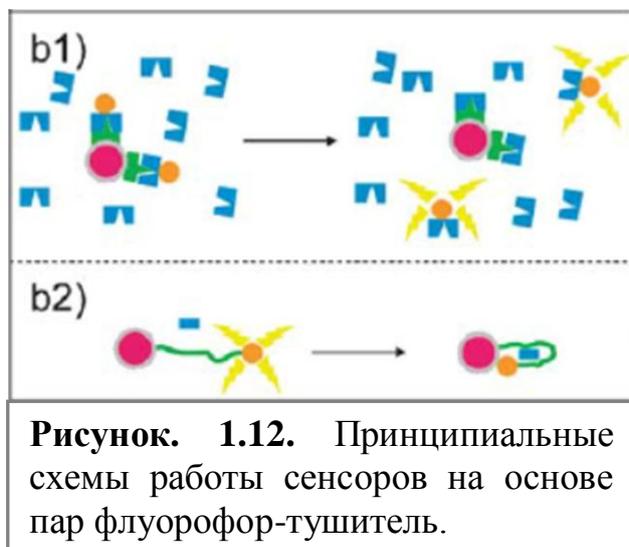
Li и соавторы провели исследование взаимодействия серии различных наночастиц золота с ДНК и определили параметры связывания. Оказалось, что НЧ золота, которые имеют самую высокую аффинность к ДНК, эффективно ингибируют репликацию ДНК [103].

Таким образом, разные авторы в ряде работ показали наличие взаимодействия НЧ золота с ДНК и их влияние на структуру ДНК и степень ее компактизации.

1.5.3 Взаимодействие наночастиц золота с флуорофорами

Взаимодействие золотых наночастиц с флуорофорами активно применяется в биосенсорике, поскольку флуоресценция многих флуорофоров

эффективно тушится в присутствии НЧ золота [104-109]. Существует две принципиальные схемы работы сенсоров (**рисунок 1.12**, [110]).



Первая схема (**рисунок 1.12**, b1) основана на конкурентном замещении. Наночастицы золота присоединены к лигандам, которые специфически связываются с определяемым веществом. Сайты связывания лигандов насыщены молекулами подобными определяемому веществу, но содержащими флуоресцентный зонд.

Таким образом, флуорофор находится вблизи НЧ золота, и флуоресценция потушена. При добавлении в раствор определяемого вещества оно конкурирует со своим флуоресцентно меченым аналогом за сайты связывания лиганда и вытесняет его, в результате чего флуорофор покидает сферу действия НЧ золота, и флуоресценция разгорается. Для осуществления второй схемы (**рисунок 1.12**, b2) необходима молекула, конформация которой изменяется при связывании с определяемым веществом. Эта молекула выступает спейсером между НЧ золота и флуорофором. В отсутствие определяемого вещества данный спейсер вытянут, и обеспечивается достаточно большое расстояние между флуорофором и тушителем, в системе наблюдается флуоресценция. Однако при связывании с определяемым веществом молекула-спейсер меняет свою конформацию, что приводит к сближению НЧ золота и флуорофора, сопровождающемуся тушением флуоресценции.

В литературе описано два основных механизма тушения флуоресценции: резонансный перенос энергии (RET) и перенос электрона [107, 111]. Однако, процесс переноса электрона в системе краситель/золотая наночастица изучен гораздо меньше чем перенос энергии. Лишь в нескольких работах подтвержден перенос электрона в системах порфиринов/НЧ золота, который сопровождался тушением флуоресценции порфиринов [112, 113].

Напротив, множество работ за последние десять лет посвящено перспективным системам для биосенсорики, основанным на резонансном переносе энергии RET, в которых акцептором энергии являются металлические наночастицы.

Классическая теория переноса энергии, впервые сформулированная Теодором Фёрстером в 1949 году, говорит о том, что перенос энергии представляет собой совокупность безызлучательных процессов в веществе, при которых энергия электронного возбуждения передаётся от возбуждённой частицы (молекулы, атома, иона) к невозбуждённой, находящейся от первой на расстоянии, меньшем длины волны возбуждающего излучения [114].

Необходимыми условиями переноса энергии являются: 1) расстояние между молекулами донора и акцептора, достаточное для осуществления процесса; 2) перекрытие спектров флуоресценции донора и возбуждения акцептора (**рисунок 1.13**).

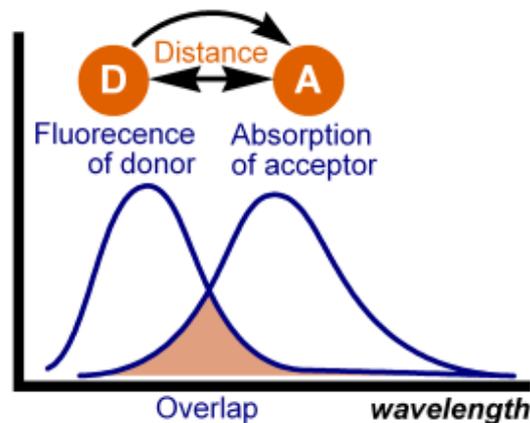


Рисунок 1.13. Схематическое изображение необходимых условий для переноса энергии.

Эффективность диполь-дипольного переноса энергии выражается формулой 1.3:

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + (r / R_0)^6}, \quad (1.3)$$

где r – расстояние между донором и акцептором, R_0 – фёрстеровский радиус, т. е. расстояние, на котором эффективность переноса энергии составляет 50%. Такая

зависимость эффективности переноса от расстояния привела к многочисленным применениям переноса энергии в биохимических исследованиях, в особенности потому, что фёрстеровский радиус находится в пределах 20 – 50 Å. Этот диапазон расстояний сравним с диаметром большинства белков и толщиной биологических мембран. Любые явления, которые оказывают влияние на расстояние между донором и акцептором, будут влиять на скорость переноса энергии, что позволяет их количественно охарактеризовать [115, 116].

Расстояния (<100 Å), необходимые для осуществления процесса переноса энергии FRET в системе двух диполей является критическим и ограничивает визуализацию объектов, находящиеся на больших расстояниях друг от друга. Хорошим решением данной проблемы стало применение металлических наночастиц в качестве акцепторов энергии в системах с переносом энергии. Авторы Chance, Prock, и Silbey описали скорость переноса энергии от диполя к поверхности металла [117], а позже Persson и Lang ввели понятие поверхностного переноса энергии (SET), которое заключается во взаимодействии электромагнитного поля диполя донора со свободными электронами проводимости металла [118].

В работе [119] сообщалось о первом успешном применении диполь-поверхностного типа передачи энергии от молекулярного диполя к поверхности наночастицы металла, что расширяет диапазон расстояний FRET более чем в 2 раза (до 250 Å). Наночастица золота Au ($d = 1,4$ нм) была присоединена к одному 5'-концу нити ДНК в качестве акцептора энергии, а флуоресцеин (FAM) – к другому 5'-концу, как энергетический донор, при этом длина ДНК варьировалась (рисунок 1.14).

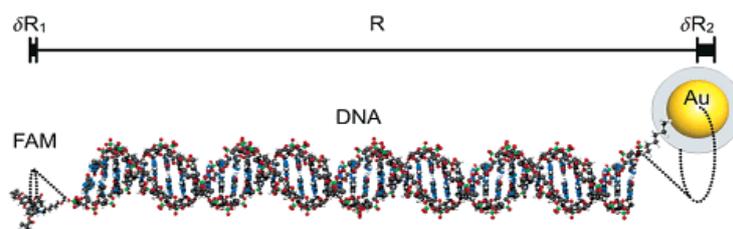


Рисунок 1.14. Присоединение наночастицы золота и флуоресцеина (FAM) к участку цепи ДНК длиной R [119].

Авторы задались вопросом, будет ли наночастица золота Au соответствовать дипольному состоянию (FRET) или же будет проявлять свойства металлической поверхности (SET). Полученные результаты показали, что данные наноразмерные кластеры золота проявляют свойства металлической поверхности по отношению к FAM.

В обзорной работе [116] авторы приводят формулу для выражения эффективности диполь-поверхностного переноса энергии **1.4**:

$$E_{SET} = \frac{1}{1 + (r / d_0)^4}, \quad (1.4)$$

где r – расстояние между донором и поверхностью акцептора, d_0 – расстояние между донором и поверхностью акцептора, на котором эффективность переноса энергии составляет 50%.

Описаны различные применения SET, например, для определения гибридизации ДНК [73, 108], для количественной характеристики взаимодействия аптамеров с тромбином [120, 121], в иммунореакциях [122, 123] и тому подобное.

Таким образом, в литературе очень широко освещены процессы комплексообразования красителей с ДНК, а также взаимодействия наночастиц золота с красителями и ДНК, которые являются основой многочисленных биологических, биохимических и медицинских применений данных красителей и наночастиц. Однако все еще остается необходимость в разработке и исследовании новых производных данных классов, которые обладают улучшенными характеристиками для различных областей применения, рассмотренных выше в литературном обзоре. Несмотря на популярность систем флуорофор-тушитель, включающих краситель в качестве зонда и наночастицы металлов в качестве тушителя флуоресценции, в различных системах для биодетекции, механизмы взаимодействия, лежащие в основе работы данных сенсорных систем, часто остаются неизученными или малоизученными, что ограничивает применение сенсоров. Для решения этих проблем в настоящей

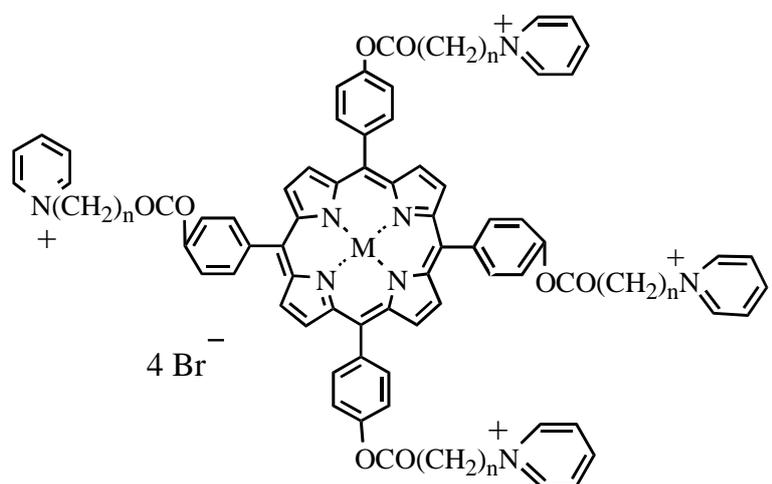
работе представлено исследование комплексообразования ряда новых синтезированных катионных тетрафенилпорфиринов с ДНК и оптических свойств этих комплексов; изучены процессы самотушения широко известного цианинового красителя SYBRGreen в различных системах на основе ДНК с целью получения информации о границах применения данного красителя во флуоресцентном анализе ДНК в биологических объектах; а также предложено объяснение механизма взаимодействия между красителем SYBRGreen и наночастицами золота в среде молекул ДНК, что может быть отправной точкой для подбора других более перспективных участников биосенсорных систем на основе подобных пар флуорофор-тушитель.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Катионные производные тетрафенилпорфиринов

Объектами исследования одной из частей настоящей работы являются приведенные ниже **производные катионных тетрафенилпорфиринов (ТФП)**, которые были синтезированы на кафедре Химии и технологии биологически активных соединений Московского государственного университета тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова под руководством к.х.н., доц. Брагиной Н.А.

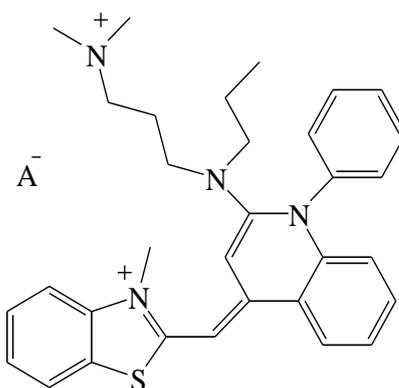


MF004	$n = 5, M = H_2$
MF005	$n = 10, M = H_2$
MF016	$n = 10, M = Zn$

ТФП исследованного ряда отличаются длиной метиленовых спейсеров, прикрепляющих пиридиниевую группу к макроциклу и наличием металла в координационной сфере порфирина. Концентрации ТФП в растворах определяли спектрофотометрически, пользуясь экспериментально определенными коэффициентами экстинкции: $\epsilon_{515} \approx 1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для MF004, $\epsilon_{516} \approx 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для MF005 и $\epsilon_{560} \approx 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для MF016.

2.1.2 Цианиновые красители

Наряду с ТФП в работе был использован широко распространенный и коммерчески доступный катионный краситель цианинового ряда **SYBRGreen I** (Sigma, США). Концентрацию SG в растворах определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{494} \approx 7,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [63]).



SYBRGreen

2.1.3 Наночастицы золота

Еще одним важным объектом исследования в данной работе были **наночастицы (НЧ) золота**, синтезированные в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина под руководством к.х.н. Рудого В.М. Исследуемые НЧ золота представляют собой коллоидный раствор (гидрозоль), содержащий частицы золота со средним диаметром $d \sim 2,5$ нм (данные динамического рассеяния света) и числовой концентрацией около 10^{15} мл⁻¹ ($\approx 2 \times 10^{-6}$ М). Молярную концентрацию НЧ золота определяли на основании количества частиц золота и постоянной Авогадро. Золь золота был синтезирован восстановлением золотохлористоводородной кислоты (HAuCl₄) хлоридом тетрагидроксиметилфосфония в щелочной среде [86]. Такие НЧ являются “квазиметаллическими”, и для них не наблюдается явление локализованного поверхностного плазмонного резонанса в исходном препарате.

2.1.4 Препараты ДНК

Использовали коммерчески доступный препарат ДНК (Деринат®), который представляет собой натриевую соль высокоочищенной деполимеризованной ультразвуком ДНК из молок осетровых рыб, с молекулярной массой $(0,27-0,5) \times 10^6$ Да, без дополнительной очистки. Водно-солевые растворы ДНК готовили на основе 10^{-2} М фосфатного (NaH₂PO₄) буфера, содержащего 0,3М NaCl (рН = 7). Концентрацию ДНК в растворе

определяли спектрофотометрически, пользуясь известным значением молярного коэффициента поглощения ($\epsilon_{260} = 6,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Жидкокристаллические дисперсии ДНК в ПЭГ-содержащем водно-солевом растворе – холестерическую жкд-ДНК (хжкд-ДНК) с содержанием ПЭГ 17% и гексагональную жкд-ДНК (гжкд-ДНК) с содержанием ПЭГ 30% – готовили в соответствии с методикой, описанной в [124]. Использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ, Serva, Германия) с молекулярной массой 4000 Да.

2.2 Методы

Исследование комплексообразования перечисленных выше веществ с биомакромолекулами проводилось с помощью спектрофотометрического, спектрофлуоресцентного методов, анизотропии флуоресценции, индуцированного кругового дихроизма и метода однофотонного счета для измерения времени жизни флуоресценции.

2.2.1 Спектрофотометрия и спектрофлуориметрия

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Shimadzu UV-3101 PC" в кварцевых кюветах ($0,4 \times 1,0 \text{ cm}$) с длиной оптического пути 1 см. Спектры флуоресценции были получены на спектрофлуориметре "Shimadzu RF-5310 PC" в кварцевой кювете ($0,4 \times 1,0 \text{ cm}$) при длине волны возбуждения в полосе поглощения соединения-лиганда (590 нм для MF004, 560 нм для MF005 и MF016, 490 нм для SG). Для измерения спектров флуоресценции образцы готовили так, чтобы оптическая плотность на длине волны возбуждения не превышала 0,1.

Квантовый выход флуоресценции комплекса красителя SG с ДНК определяли относительно стандарта – раствора флуоресцеина, который имеет близкое значение длины волны возбуждения и флуоресценции к исследуемому SG в комплексе с ДНК, согласно формуле **2.1**:

$$\Phi_{f12} = \Phi_{f11} \cdot S_{f12} \cdot n_2^2 \cdot \epsilon_1 c_1 / S_{f11} \cdot n_1^2 \cdot \epsilon_2 c_2 \quad (2.1)$$

где Φ_{f12} и Φ_{f11} – квантовые выходы флуоресценции комплекса красителя SG с ДНК в буферном растворе и флуоресцеина в буферном растворе, соответственно,

$\Phi_{fl} = 0,92$ [125]; S_{fl1} и S_{fl2} – площади под спектрами флуоресценции ($\lambda_{возб.} = 490$ нм) флуоресцеина и комплекса красителя SG с ДНК в буферном растворе, соответственно; n_1 и n_2 – показатели преломления воды и раствора ДНК, соответственно; $\varepsilon_1 c_1$ и $\varepsilon_2 c_2$ – поглощение растворов флуоресцеина и комплекса SG с ДНК в буфере при $\lambda_{возб.} = 490$ нм, соответственно. Концентрации флуоресцеина и SG в комплексах с ДНК подбирали таким образом, чтобы их поглощение на длине волны возбуждения составляло $< 0,1$.

2.2.2 Анизотропия флуоресценции

При возбуждении образца поляризованным светом происходит селективное возбуждение молекул флуорофора, для которых дипольный момент перехода при поглощении параллелен электрическому вектору возбуждающего излучения. Такое фотоселективное возбуждение приводит к частично поляризованному испусканию флуоресценции.

Анизотропию флуоресценции r определяли по формуле 2.2:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH} \cdot G}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH} \cdot G}, \quad (2.2)$$

где I_{VV} и I_{VH} – интенсивности флуоресценции вертикально и горизонтально поляризованной флуоресценции при возбуждении образца вертикально поляризованным светом, G -фактор, который представляет собой отношение чувствительности детектирующей системы для вертикально и горизонтально поляризованного света и определяется по формуле 2.3:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2.3)$$

где I_{HV} и I_{HH} – интенсивности флуоресценции вертикально и горизонтально поляризованной флуоресценции при возбуждении образца горизонтально поляризованным светом.

Измерения спектров анизотропии флуоресценции красителя SG производили на приборе Fluo Time 300 (Picoquant GmbH, Германия), в кварцевой

кювете (0,4 см × 1,0 см) при возбуждении образцов светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб.}} = 480,2 \pm 5$ нм, используя диодный лазер LDH-P-C-480.

2.2.3 Метод однофотонного счета

Измерения времени жизни флуоресценции были выполнены методом счета коррелированных во времени фотонов.

Для ТФП использовали спектрометр Fluo Time 200 (Picoquant GmbH, Германия) при фотовозбуждении образцов полупроводниковыми лазерами с длинами волн $\lambda=440$ нм и $\lambda=653$ нм, длительность импульса 100 пс. Измерения проводили в кварцевой кювете (0,4 × 1,0 см) в режиме однофотонного счета в области флуоресценции хромофоров при $\lambda = 656$ нм и $\lambda = 670$ нм.

Для систем, содержащих SG, времена жизни флуоресценции были измерены на приборе Fluo Time 300 (Picoquant GmbH, Германия), снабженного модулем сбора данных PicoHarp 300 TCSPC и импульсным источником питания PDL 820. Измерения проводили в кварцевой кювете (1,0 см × 1,0 см) при возбуждении образцов светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб.}} = 480,2 \pm 5$ нм, используя диодный лазер LDH-P-C-480, длительность оптического импульса 30 пс. Сигнал флуоресценции регистрировали при помощи микроканального ФЭУ R3809U-50 (Hamamatsu, Япония) в области флуоресценции SG $\lambda = 525$ нм с использованием оптического фильтра с пропусканием $\lambda > 500$ нм (ЖС-17).

Полученные данные обрабатывали в рамках экспоненциальной модели с применением процедуры обратной свертки (использовали пакет программ FluoFit) по следующей формуле 2.4:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' \quad (2.4)$$

где A_i – амплитуда i -ой компоненты в начальный момент времени, τ_i – время жизни флуоресценции i -ой компоненты, IRF – экспериментально измеренная импульсная переходная функция, являющаяся характеристикой источника излучения, в данном случае лазера. В качестве критерия качества аппроксимации

использовали величину взвешенного среднего квадратического отклонения χ^2 ($\chi^2 \leq 1,3$).

2.2.4 Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма (КД) были получены на дихрометре СКД-2М (спектральная ширина щели 5 нм) в кварцевой кювете ($0,4 \times 1,0$ см), оптический путь 1 см. Время накопления составляло $t_{\text{нак}} = 4,8$ сек, шаг развертки спектра – 2,6 нм.

Спектр КД представляет собой зависимость величины $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ – оптической плотности кругового дихроизма в оптических единицах – от длины волны (λ). В спектре КД в области поглощения оптически активных хромофоров, имеющих в молекуле, присутствует экстремум, который в зависимости от соотношения между величинами A_L и A_R может быть либо положительным, либо отрицательным. В методе КД также используют величину дихроичного поглощения $\Delta \varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r = \Delta A / (l \cdot c)$, где A – оптическая плотность кругового дихроизма; c – концентрация в М, и величину эллиптичности $[\theta] = 100\varphi / l \cdot c$. Эти две величины связаны между собой соотношением $[\theta] = 3300 \cdot \Delta \varepsilon$.

Глава 3. Комплексообразование катионных тетрафенилпорфиринов с ДНК

Для исследования взаимодействия катионных ТФП с ДНК был использован комплекс методов, включая спектрофотометрический и спектрофлуориметрический методы, а также спектроскопию кругового дихроизма и время-разрешенную флуоресцентную спектроскопию.

3.1 Спектрофотометрическое исследование взаимодействия катионных производных тетрафенилпорфиринов с ДНК

Отличительной особенностью спектров поглощения порфиринов является наличие полосы Sore ($\lambda \sim 220\text{--}240$ нм) и нескольких Q-полос в области от ~ 520 до ~ 650 нм. Комплексообразование порфириновых производных с ДНК характеризуется такими изменениями в спектрах поглощения порфиринов, как батохромный сдвиг всех полос спектра, гипохромный эффект полосы Sore (уменьшение коэффициента экстинкции при комплексообразовании), а также гиперхромный эффект Q-полос спектра (увеличение коэффициента экстинкции при комплексообразовании) [26]. При этом молекулы порфиринов могут как интеркалировать между парами азотистых оснований, так и связываться с ДНК путем залегания по малой бороздке [126].

На **рисунке 3.1** представлены спектры поглощения растворов порфирина MF004 в присутствии ДНК [127]. Наблюдается возрастание интенсивности поглощения Q-полос спектра ($\lambda = 517$ нм, $\lambda = 551$ нм, $\lambda = 590$ нм, $\lambda = 645$ нм) и уменьшение интенсивности поглощения в полосе Sore ($\lambda = 418$ нм) (**рисунок 3.1**, вставка). Одновременно наблюдается небольшой батохромный сдвиг всех максимумов спектра (2 нм), что указывает на образование комплекса MF004-ДНК. Отсутствие изобестической точки в спектрах поглощения MF004 при титровании возрастающими концентрациями ДНК свидетельствует о том, что имеется сложное равновесие, которое соответствует образованию в растворе нескольких типов комплексов.

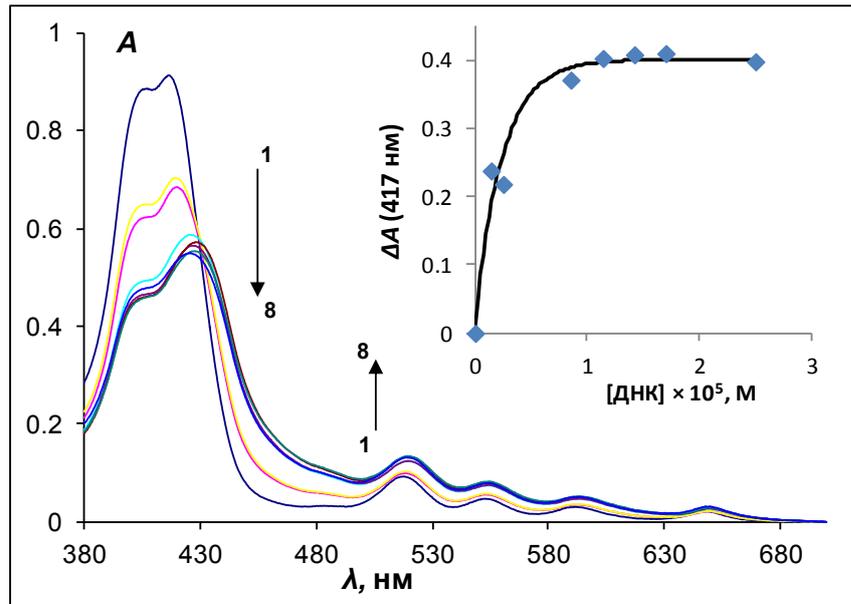


Рисунок 3.1. Спектры поглощения MF004 (1×10^{-5} М) в 10 мМ Na^+ -фосфатном буферном растворе ($\text{pH} = 7$) при различных концентрациях ДНК: 0 (1); $1,4 \times 10^{-6}$ (2); $2,5 \times 10^{-6}$ (3); $8,5 \times 10^{-6}$ (4); $1,1 \times 10^{-5}$ (5); $1,4 \times 10^{-5}$ (6); $1,7 \times 10^{-5}$ (7); $2,5 \times 10^{-5}$ (8) М. Вставка: зависимость изменения оптической плотности при 417 нм для MF004 от концентрации ДНК.

Таким образом, в растворе фосфатного буфера порфириновое производное образует комплекс с молекулой ДНК, и этому процессу соответствует равновесие, характеризуемое равновесной константой K_b в соответствии с уравнением (3.1):



Равновесную константу комплексообразования для исследуемых катионных ТФП с ДНК определяли по изменению оптической плотности в полосе Sore , для MF004 при $\lambda = 417$ нм, при добавлении ДНК согласно уравнению Бенеси-Гильдебранда (уравнение 3.2):

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \varepsilon [\text{MF}]} + \frac{1}{K_b (\Delta \varepsilon [\text{MF}])} \cdot \frac{1}{[\text{DNA}]} \quad (3.2)$$

$$K_b = \frac{[\text{MF}]_b}{[\text{MF}]_{free} \cdot [\text{DNA}]} \quad (3.3)$$

В уравнении (3.2) $\Delta \varepsilon$ – это разность коэффициентов экстинкции свободного и связанного состояний, а K_b – равновесная константа комплексообразования, определяемая по уравнению (3.3), где индексы b и $free$ соответствуют

концентрациям соединения-лиганда, связанного с ДНК и свободного, соответственно.

Графическое выражение уравнения Бенеша-Гильдебранда для красителя MF004 и ДНК представлено на **рисунке 3.2**. Величина константы K_b рассчитывается из отношения отрезка, отсекаемого прямой по оси ординат, и наклона этой линии **(3.4)** [128].

$$K_b = \left(\frac{1}{\Delta\varepsilon[MF]} \right) / \left(\frac{1}{K_b \cdot \Delta\varepsilon[MF]} \right) \quad (3.4)$$

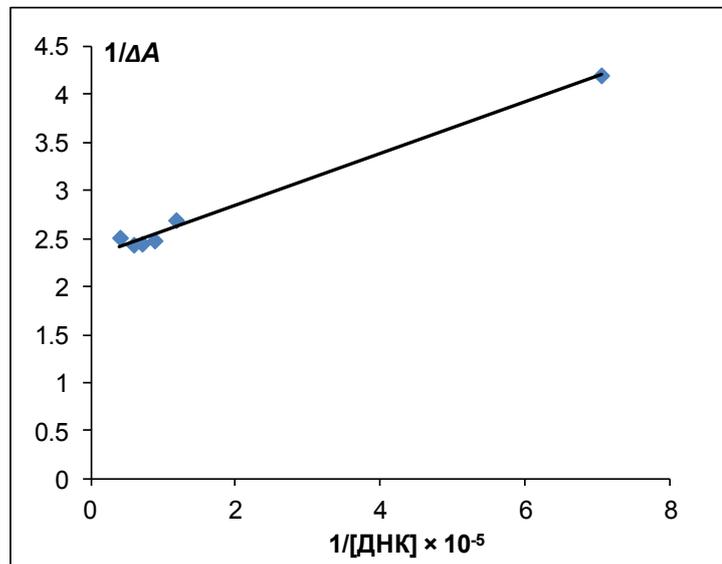


Рисунок 3.2. Зависимость поглощения красителя MF004 (1×10^{-5} M) от концентрации ДНК в координатах Бенеша-Гильдебранда.

Соответственно, для производного MF004 с ДНК получили значение константы комплексообразования $K_b = 8,7 \pm 0,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Аналогичные измерения и расчеты проводили с соединениями MF005 и MF016. На **рисунке 3.3** представлены спектры поглощения MF005 в присутствии различных концентраций ДНК [127]. Наблюдается возрастание интенсивности Q-полос ($\lambda = 518 \text{ нм}$, $\lambda = 551 \text{ нм}$, $\lambda = 591 \text{ нм}$, $\lambda = 646 \text{ нм}$) и уменьшение интенсивности полосы Core ($\lambda = 420 \text{ нм}$) в спектре поглощения (**рисунк 3.3**, вставка). Небольшой батохромный сдвиг (2 нм), как и в случае MF004, в купе с изменением интенсивности поглощения полос спектра свидетельствуют об образовании комплекса MF005-ДНК. Отсутствие изобестической точки в

спектрах поглощения MF005 при титровании возрастающими концентрациями ДНК свидетельствует о том, что образуется больше одного типа комплексов.

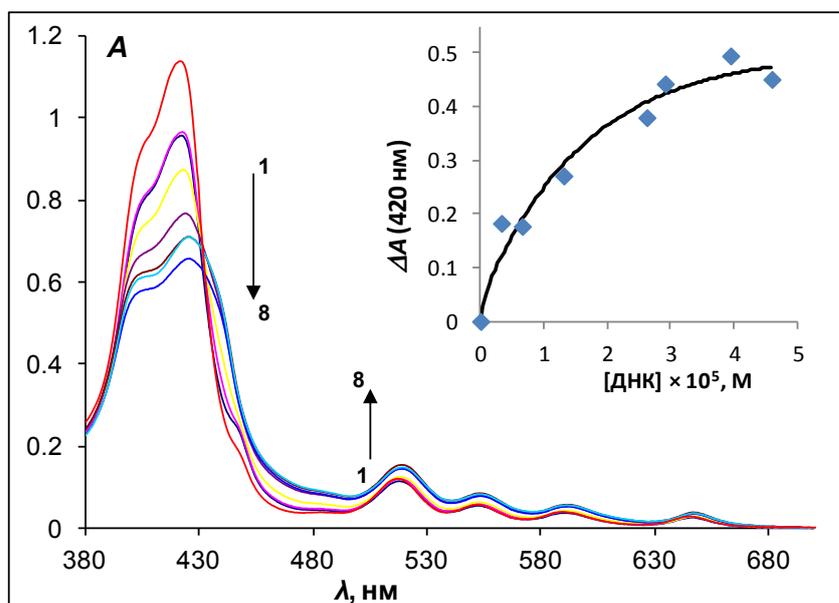


Рисунок 3.3. Спектры поглощения MF005 (1×10^{-5} M) в 10 mM Na⁺-фосфатном буферном растворе (pH = 7) при различных концентрациях ДНК $C_{\text{ДНК}} = 0$ (1); $3,3 \times 10^{-6}$ (2); $6,6 \times 10^{-6}$ (3); $1,3 \times 10^{-5}$ (4); $2,6 \times 10^{-5}$ (5); $2,9 \times 10^{-5}$ (6); $3,9 \times 10^{-5}$ (7); $4,6 \times 10^{-5}$ (8) M. Вставка: зависимость изменения оптической плотности при 420 нм для MF005 от концентрации ДНК.

Константу комплексообразования MF005 с ДНК определяли по изменению оптической плотности ($\lambda = 420$ нм) при добавлении ДНК из графика в координатах Бенеша-Гильдебранда, представленного на **рисунке 3.4**, и получили значение $K_b = 1,8 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

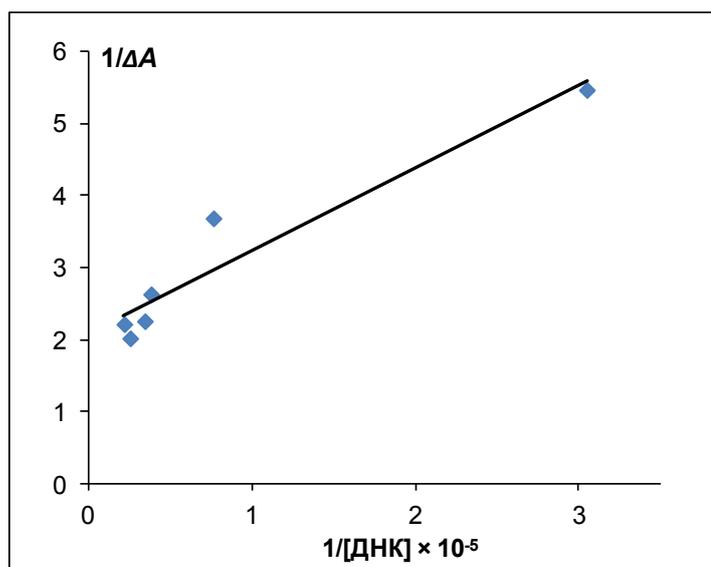


Рисунок 3.4. Зависимость поглощения красителя MF005 (1×10^{-5} M) от концентрации ДНК в координатах Бенеша-Гильдебранда.

На **рисунках 3.5** и **3.6** представлены спектры поглощения MF016 в присутствии ДНК и зависимость поглощения красителя от концентрации нуклеиновой кислоты в координатах Бенеша-Гильдебранда для данного взаимодействия [127]. Возрастание интенсивности полос ($\lambda = 560$ нм и $\lambda = 600$ нм) одновременно с уменьшением интенсивности полосы Core ($\lambda = 419$ нм) в спектре поглощения и батохромный сдвиг (8 нм) свидетельствуют об образовании комплекса MF016-ДНК. Возможное образование более одного типа комплексов можно предположить из-за отсутствия изобестической точки в спектрах поглощения MF016 при титровании возрастающими концентрациями ДНК.

Константу комплексообразования MF016 с ДНК определяли по изменению оптической плотности при $\lambda = 419$ нм при добавлении ДНК из графика, представленного на **рисунке 3.6**, и получили значение $K_b = 1,3 \pm 0,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

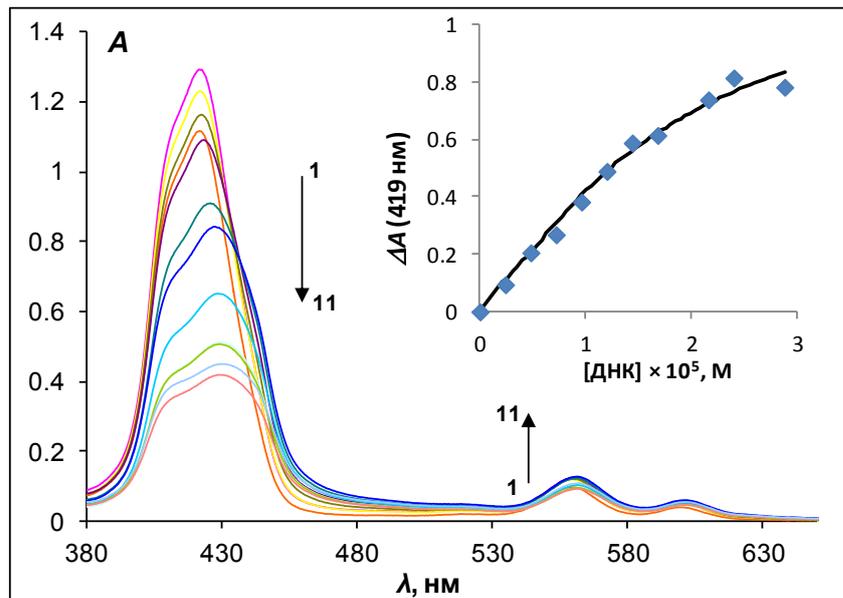


Рисунок 3.5. Спектры поглощения MF016 (1×10^{-5} M) в 10 mM Na^+ -фосфатном буферном растворе ($\text{pH} = 7$) при различных концентрациях ДНК: $1,2 \times 10^{-6}$ (1); $2,4 \times 10^{-6}$ (2); $4,8 \times 10^{-6}$ (3); $7,2 \times 10^{-6}$ (4); $1,2 \times 10^{-5}$ (5); $1,4 \times 10^{-5}$ (6); $1,7 \times 10^{-5}$ (7); $1,9 \times 10^{-5}$ (8); $2,2 \times 10^{-5}$ (9); $2,4 \times 10^{-5}$ (10); $2,9 \times 10^{-5}$ (11) M. Вставка: зависимость изменения оптической плотности при 419 нм для MF016 от концентрации ДНК.

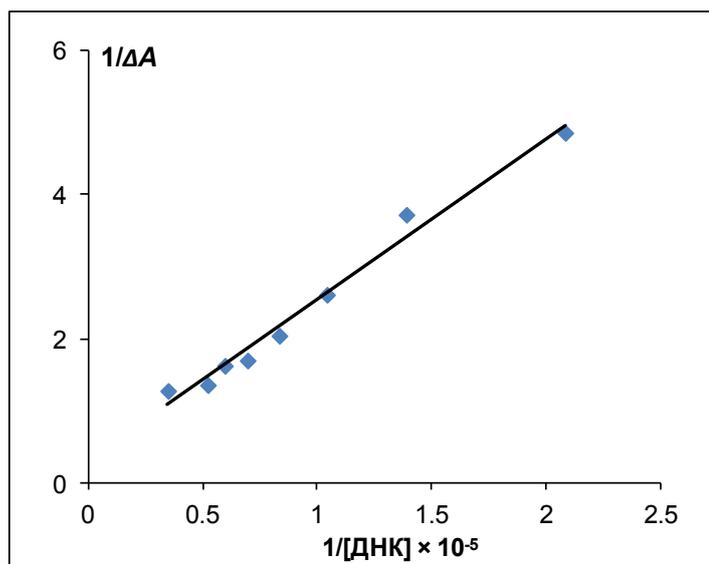


Рисунок 3.6. Зависимость поглощения красителя MF016 (1×10^{-5} М) от концентрации ДНК в координатах Бенеси-Гильдебранда.

Таким образом, полученные эффективные константы связывания выбранных ТФП с ДНК (**таблица 3.1**) сильно зависят от строения порфиринов, и их склонность к комплексообразованию с дуплексом определяется стерическими затруднениями в структуре, такими как цепи (спейсеры) различной длины в мезо-положениях порфирина и атом металла, координированный в макроцикле порфирина [127].

Таблица 3.1. Эффективные константы комплексообразования ТФП с ДНК

Формула соединения	K_b, M^{-1}
MF004, $n = 5, M = H_2$	$8,7 \pm 0,3 \times 10^5$
MF005, $n = 10, M = H_2$	$1,8 \pm 0,1 \times 10^5$
MF016, $n = 10, M = Zn$	$1,3 \pm 0,5 \times 10^4$

При переходе от спейсера с пятью CH_2 -группами (MF004) к соединению, имеющему спейсер с десятью CH_2 -группами, (MF005) увеличение стерических препятствий приводит к резкому уменьшению константы комплексообразования. Можно предположить, что введение Zn в соединение MF016 обеспечивает изменение геометрии порфиринового кольца, которое препятствует интеркаляции макроцикла порфирина между азотистыми основаниями в молекуле ДНК. Кроме того, наличие двухзарядного иона Zn^{2+} в порфириновом

кольце и отсутствие двух атомов водорода в макроцикле не дает возможности образовывать водородные связи между молекулами порфирина и образующими двойную спираль основаниями в структуре ДНК. Этот факт обуславливает сильное уменьшение константы взаимодействия металлокомплекса (MF016) по сравнению с производным, не содержащим металл, (MF005) [127].

3.2 Исследование взаимодействия производных катионных тетрафенилпорфиринов с ДНК методом кругового дихроизма

Дополнительное подтверждение образования комплексов порфиринов и молекул ДНК было получено при исследовании спектров кругового дихроизма. Молекулы исследуемых ТФП в растворе не имеют ассиметричного атома углерода, вследствие чего являются оптически неактивными. Комплексообразование с молекулой ДНК приводит к встраиванию порфирина в структуру двухцепочечной нуклеиновой кислоты, которая имеет асимметрию, обусловленную структурой двойной спирали молекулы ДНК, что в конечном итоге приводит к возникновению индуцированной оптической активности в области полосы Соре спектра поглощения данного соединения. Это обуславливает появление в растворах порфиринов в присутствии молекул ДНК спектров индуцированного кругового дихроизма. В литературе также описано наличие подобной индуцированной оптической активности в области полосы Соре в спектрах КД димеров, состоящих из двух порфириновых субъединиц, связанных хиральным спейсером [129].

На **рисунке 3.7** приведены спектры КД ДНК, зарегистрированные в отсутствие (кривая 1) и в присутствии ТФП MF004 (кривая 2). Видно, что в отсутствие MF004 в спектре КД наблюдается только одна положительная полоса, расположенная в области $\lambda = 250\text{--}300$ нм, которая характеризует молекулярную оптическую активность азотистых оснований в составе линейных двухцепочечных молекул ДНК. Амплитуда этой полосы ($\Delta\varepsilon$), выраженная в единицах $\Delta\varepsilon$, составляет с учетом концентрации ДНК ~ 2 ед. При добавлении MF004 к ДНК в спектре КД появляется дополнительная полоса в интервале длин

волн 390–450 нм, имеющая сложную форму, которая обусловлена образованием комплекса MF004 с молекулами ДНК. Этот результат согласуется с приведенными выше данными, полученными при помощи спектрофотометрического метода анализа.

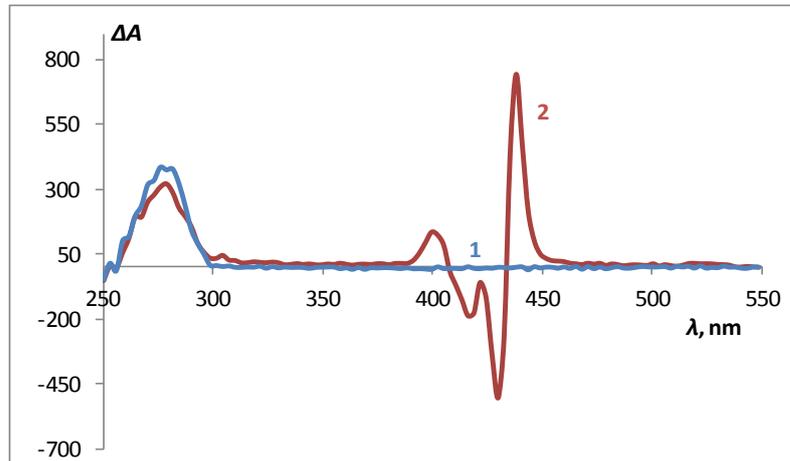


Рисунок 3.7. Спектры КД ДНК ($1,7 \times 10^{-4}$ М) в 10 мМ фосфатном буфере (рН = 7) при различных концентрациях MF004: 1 – $C_{MF004} = 0$; 2 – $C_{MF004} = 1 \times 10^{-5}$ М. $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ о. е.; $L = 1$ см, $T = 22^\circ\text{C}$.

На **рисунке 3.8** приведены спектры КД ДНК, зарегистрированные в отсутствие (кривая 1) и в присутствии MF016, (кривая 2).

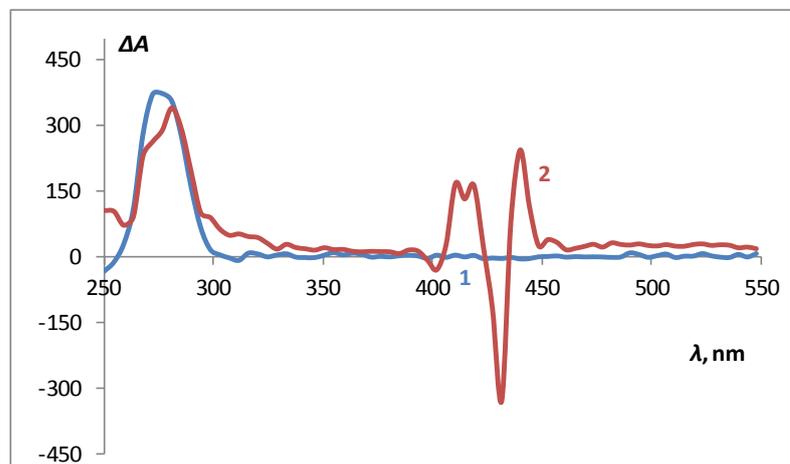


Рисунок 3.8. Спектры КД ДНК ($1,7 \times 10^{-4}$ М) в 10 мМ Na^+ -фосфатном буфере (рН = 7) при различных концентрациях MF016: 1 – $C_{MF016} = 0$; 2 – $C_{MF016} = 2,6 \times 10^{-5}$ М. $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ о. е.; $L = 1$ см, $T = 22^\circ\text{C}$.

В отсутствие MF016 в спектре наблюдается только положительная полоса в области поглощения азотистых оснований ДНК ($\lambda = 250\text{--}300$ нм). При добавлении MF016 в интервале длин волн 400–450 нм в спектре КД появляется дополнительная полоса индуцированного КД, имеющая сложную форму, которая

свидетельствует об образовании комплекса MF016 с молекулами ДНК. Этот результат согласуется с приведенными выше данными, полученными при помощи спектрофотометрического анализа.

На **рисунке 3.9** приведены спектры КД ДНК, зарегистрированные в отсутствие (кривая 1) и в присутствии MF005 (кривая 2). Аналогично двум предыдущим случаям в отсутствие красителя в спектре КД наблюдается положительная полоса ($\lambda = 250\text{--}300$ нм) в области поглощения ДНК. Однако при добавлении красителя MF005 к ДНК в спектре происходят очень незначительные изменения в области, соответствующей полосе Core данного ТФП ($\lambda = 410\text{--}430$ нм). Одним объяснением такого эффекта может быть отсутствие комплексообразования между MF005 и ДНК, что противоречит данным спектрофотометрического анализа, согласно которым константа комплексообразования данного ТФП с ДНК составляет $K_b = 1,8 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Другим объяснением может быть наличие двух типов комплексов ТФП-ДНК (интеркаляционный и внешний) в примерно равном соотношении, в которых молекулы красителя расположены на ДНК таким образом, что их сигналы КД нивелируют друг друга. Итак, данный спектр не является информативным, и требуется дополнительное исследование данной системы.

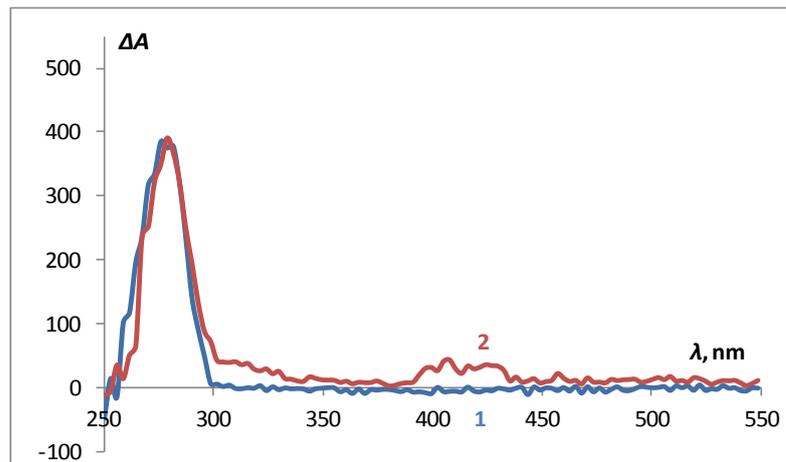


Рисунок 3.9. Спектры КД ДНК ($1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$) в 10 mM Na^+ -фосфатном буфере ($\text{pH} = 7$) при различных концентрациях MF005: 1 – $C_{\text{MF005}} = 0$; 2 – $C_{\text{MF005}} = 2,26 \times 10^{-5} \text{ M}$. $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ о. е.; $L = 1 \text{ см}$, $T = 22^\circ\text{C}$.

Структурным методом кругового дихроизма было подтверждено комплексообразование производного MF004, содержащего менее объемные

заместители, и MF016, несущего длинные спейсеры и металл в макроцикле порфирина, с ДНК. Для подтверждения образования комплекса ДНК и производного MF005, характеризующегося длинными метиленовыми спейсерами, но не включающего металл, потребуются дополнительные исследования.

3.3 Определение типа комплекса, образуемого тетрафенилпорфиринами с ДНК в составе холестерической жидкокristаллической дисперсии, по спектрам кругового дихроизма

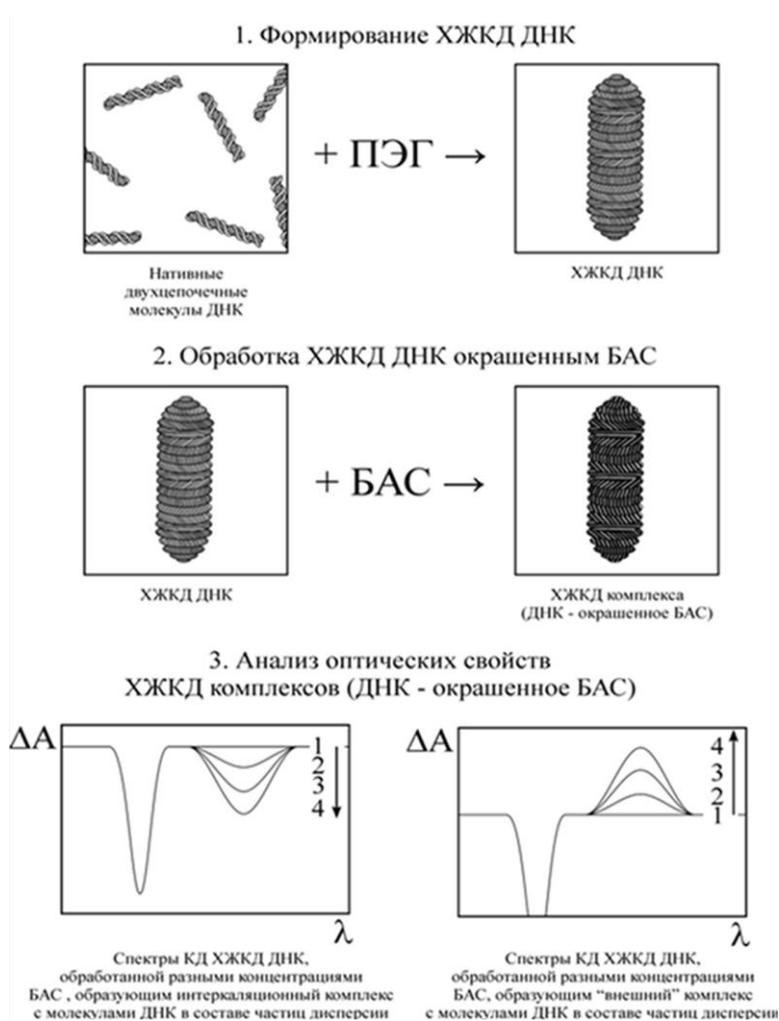


Рисунок 3.10. Эксперимент по выяснению механизма связывания исследуемых соединений с ДНК.

Теория оптических свойств несовершенных поглощающих холестерических жидких кристаллов свидетельствует о том, что в состав холестерических жидкокristаллических дисперсий ДНК (хжкд-ДНК) можно вводить дополнительные хромофоры (кроме азотистых оснований). Удобным приемом для такого введения является образование комплексов между дополнительными хромофорами и молекулами ДНК (рисунок 3.10, 2). Если вторичная структура ДНК при введении дополнительного хромофора существенно не нарушается,

этот теоретический подход можно применить для описания оптических свойств хжкд-ДНК, сформированных из комплексов ДНК с окрашенными биологически

активными соединениями (БАС). Такие хжкд-ДНК содержат в своем составе уже не один, как в случае обычных хжкд-ДНК, а, как минимум два поглощающих элемента – азотистые основания НК и окрашенное БАС.

Следовательно, если молекулы комплексов (ДНК-окрашенное БАС) образуют хжкд-ДНК, то на основании теоретического анализа можно предсказать появление в спектре КД этой дисперсии не одной, а двух аномальных полос, одна из которых будет расположена в области поглощения ДНК, а другая – в области поглощения хромофоров окрашенного БАС (**рисунок 3.10, 3**) [21]. Первая полоса в этом случае будет выступать в качестве “внутреннего” стандарта качества сформированной хжкд-ДНК. Знак второй аномальной полосы будет совпадать со знаком полосы в области поглощения хромофоров ДНК в тех случаях, когда обе полосы расположены по одну сторону от полосы селективного отражения [26, 130]. Кроме того, знак второй полосы зависит от ориентации молекул окрашенного БАС по отношению к длинной оси молекулы ДНК [1]. Если угол наклона молекул окрашенного БАС по отношению к длинной оси молекулы ДНК составляет $\sim 90^\circ$ (что имеет место при интеркаляции [4]), знак аномальной полосы, возникающей в спектре КД в области поглощения окрашенного БАС, будет совпадать со знаком полосы, характерной для азотистых оснований ДНК, расположенных, как известно, под углом $\sim 90^\circ$ по отношению к оси спирали ДНК. Если же окрашенное БАС располагается на молекуле ДНК так, что угол наклона плоскости его хромофора по отношению к длинной оси молекулы ДНК находится в пределах от 0 до 54° , интенсивная полоса в спектре КД в области поглощения этого БАС будет иметь знак, противоположный знаку полосы, характерной для азотистых оснований ДНК, т. е. будет положительным. Следовательно, оптические свойства хжкд-ДНК комплексов (ДНК-окрашенное БАС) можно использовать как для установления способа расположения молекул окрашенных БАС на спиральной структуре двухцепочечной молекулы ДНК, так и для определения наличия и концентрации окрашенного БАС в анализируемой пробе (**рисунок 3.10, 3**).

Для подтверждения комплексообразования производных катионных порфиринов с ДНК и выяснения вопроса о типе образуемых комплексов были проанализированы особенности спектров КД жидкокристаллической дисперсии, сформированной из молекул комплекса (порфирин-ДНК).

На **рисунке 3.11** приведен спектр поглощения и структурная формула производного катионного порфирина – тетраиодида тетра(4-N-метилпиридил)порфирина (порфирин). Это производное порфирина является классическим интеркалятором, что подробно описано в литературе [68].

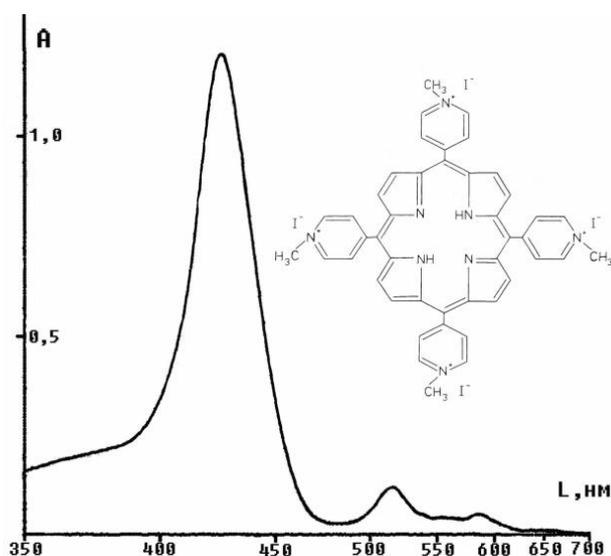


Рисунок 3.11. Структура и спектр поглощения тетраиодида тетра(4-N-метилпиридил)порфирина.

Спектр КД хжкд-ДНК, сформированной из молекул комплекса порфирин-ДНК, представлен на **рисунке 3.12**. Нетрудно видеть, появление в спектре КД интенсивной (аномальной) отрицательной полосы ($\lambda \sim 270$ нм), обусловленной пространственной спиральной закруткой молекул ДНК, образующих частицы дисперсии (кривая 1). После добавления порфирина в спектре КД хжкд-ДНК появляется дополнительная отрицательная полоса ($\lambda \sim 425$ нм), расположенная в области поглощения хромофора (380–440 нм) (кривая 2). Согласно теории [68], возникновение этой полосы обусловлено взаимодействием порфирина с двухцепочечными молекулами ДНК в составе частиц хжкд-ДНК.

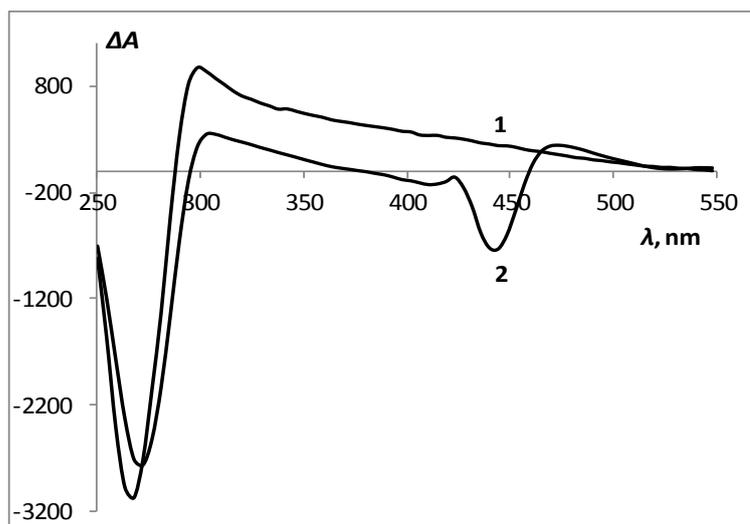


Рисунок 3.12. Спектры КД хжкд-ДНК до (кривая 1) и после (кривая 2) обработки порфирином.

Для определения механизма связывания исследуемых соединений MF004, MF005, MF016 сравним спектры КД жидкокристаллической дисперсии комплексов производных порфиринов с ДНК в составе хжкд-ДНК со спектром КД классического интеркалятора тетра(4-N-метилпиридил)порфирина.

На **рисунке 3.13** приведены спектры КД хжкд-ДНК до (кривая 1) и после (кривая 2) обработки MF004 [127]. Нетрудно видеть, что образование хжкд-ДНК сопровождается появлением в спектре КД интенсивной (аномальной) отрицательной полосы ($\lambda \sim 270$ нм), расположенной в области поглощения азотистых оснований (кривая 1). Появление этой полосы обусловлено пространственной спиральной закруткой молекул ДНК, образующих частицы дисперсии. После добавления соединения MF004 в спектре КД хжкд-ДНК появляется дополнительная полоса сложной формы (кривая 2), расположенная в области поглощения хромофора MF004 (380–440 нм). Возникновение этой полосы обусловлено взаимодействием хромофора с двухцепочечными молекулами ДНК в составе частиц хжкд-ДНК. Знак основной полосы ($\lambda \sim 410$ нм) – отрицательный, как и в случае с классическим интеркалятором – тетра(4-N-метилпиридил)порфирином. Это свидетельствует о том, что молекулы порфирина MF004, взаимодействуя с ДНК, преимущественно встраиваются (интеркалируют) между парами азотистых оснований подобно тетра(4-N-метилпиридил)порфирину и размещаются между основаниями двухцепочечной

ДНК перпендикулярно к оси двойной спирали нуклеиновой кислоты. Кроме того, сигнал индуцированной оптической активности хромофора MF004 при взаимодействии с хжкд-ДНК имеет составляющую с положительным знаком ($\lambda \sim 440$ нм), что свидетельствует о наличии другого типа комплекса, образованного посредством залегания лиганда в малой бороздке двухцепочечной НК. При этом вклад внешнего комплекса незначительный и основным типом связывания при комплексообразовании является интеркаляция.

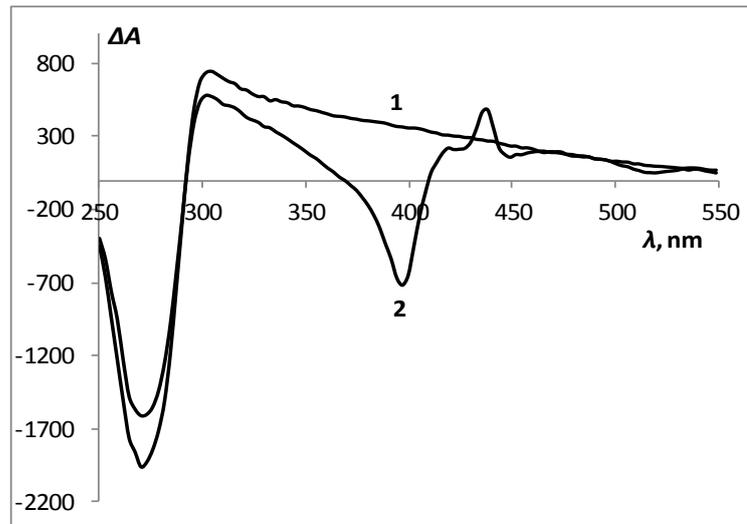


Рисунок 3.13. Спектры КД хжкд-ДНК ($4,5 \times 10^{-5}$ М) в 2 мМ Na^+ -фосфатном буфере (рН = 7), 0,3 М NaCl и ПЭГ ($4,25 \times 10^{-2}$ М) до и после обработки MF004. 1 – $C_{\text{MF004}} = 0$; 2 – $C_{\text{MF004}} = 7 \times 10^{-6}$ М. $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ о. е.; $L = 1$ см, $T = 22$ °С.

На **рисунке 3.14** приведены спектры КД хжкд-ДНК до (кривая 1) и после (кривая 2) обработки MF016 [127]. Образование хжкд-ДНК сопровождается появлением в спектре КД интенсивной (аномальной) отрицательной полосы ($\lambda \sim 270$ нм) в области поглощения азотистых оснований (кривая 1). После добавления соединения MF016 в спектре КД хжкд-ДНК появляется дополнительная полоса сложной формы в области поглощения хромофора MF016 (380–440 нм) (кривая 2), что свидетельствует о взаимодействии хромофора с двухцепочечными молекулами ДНК в составе частиц хжкд-ДНК. Положительный знак основной полосы ($\lambda \sim 425$ нм) в противоположность тетра(4-N-метилпиридил)порфирина свидетельствует о том, что молекулы MF016 образуют с молекулами ДНК внешний комплекс, т. е. размещаются в малой бороздке двойной спирали нуклеиновой кислоты. Кроме того, сигнал

индуцированной оптической активности хромофора MF016 при взаимодействии с хжкд-ДНК имеет составляющую с отрицательным знаком ($\lambda \sim 410$ нм), что свидетельствует о наличии другого типа комплекса, образованного посредством интеркаляции лиганда между парами азотистых оснований двухцепочечной НК. В данном случае вклад интеркаляционного комплекса небольшой и преимущественным типом связывания будет комплексообразование посредством залегания лиганда в узкой бороздке ДНК.

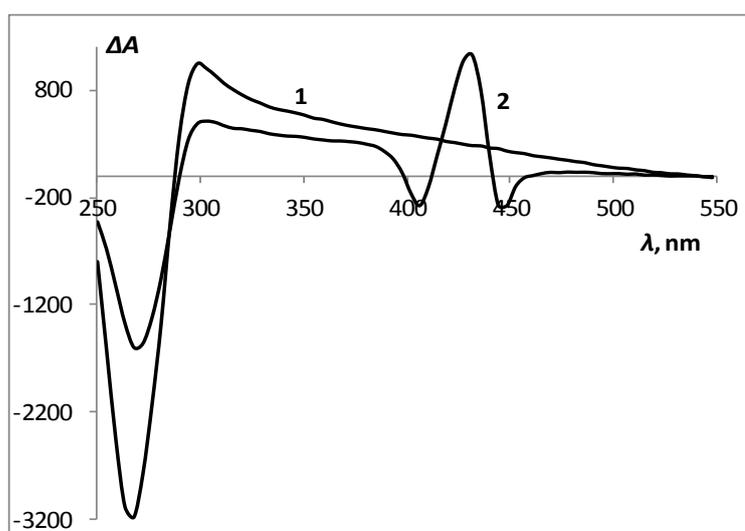


Рисунок 3.14. Спектры КД хжкд-ДНК ($4,5 \times 10^{-5}$ М) в 2 мМ Na^+ -фосфатном буфере (рН = 7), 0,3 М NaCl и ПЭГ ($4,25 \times 10^{-2}$ М) до и после обработки MF016. 1 – $C_{\text{MF016}} = 0$; 2 – $C_{\text{MF016}} = 1,25 \times 10^{-5}$ М. $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ о. е.; $L = 1$ см, $T = 22$ °С.

На **рисунке 3.15** приведены спектры КД хжкд-ДНК до (кривая 1) и после (кривая 2) обработки MF005 [127]. Появление в спектре КД интенсивной (аномальной) отрицательной полосы ($\lambda \sim 270$ нм) в области поглощения азотистых оснований обусловлено образованием хжкд-ДНК (кривая 1). Добавление соединения MF005 приводит к появлению в спектре КД хжкд-ДНК дополнительной полосы сложной формы (кривая 2) в области поглощения хромофора MF005 (380–440 нм). Таким образом, подтверждается взаимодействием хромофора MF005 с двухцепочечными молекулами ДНК в составе частиц хжкд-ДНК. В отличие от спектра классического интеркалятора – тетра(4-N-метилпиридил)порфирина (**рисунке 3.12**, кривая 2) сигнал индуцированной оптической активности хромофора MF005 (**рисунке 3.15**,

кривая 2) имеет составляющие с положительным ($\lambda \sim 420$ нм) и отрицательным ($\lambda \sim 400$ нм) знаками с приблизительно равными амплитудами. Это можно интерпретировать таким образом, что молекулы MF005 образуют с ДНК два типа комплексов: интеркаляционный комплекс и внешний комплекс, т. е. часть молекул встраивается между парами оснований, а другие размещаются в малой бороздке двойной спирали нуклеиновой кислоты. И в этом случае образуются оба типа комплексов, интеркаляционный и комплекс залегания, примерно в одинаковом соотношении.

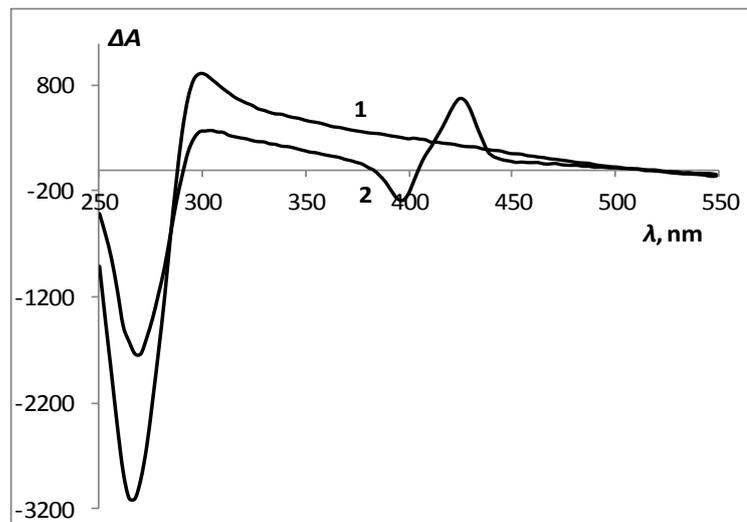


Рисунок 3.15. Спектры КД хжкд-ДНК ($4,5 \times 10^{-5}$ М) в 2 мМ Na^+ -фосфатном буфере ($\text{pH} = 7$), 0,3 М NaCl и ПЭГ ($4,25 \times 10^{-2}$ М) до и после обработки MF005. 1 – $C_{\text{MF005}} = 0$; 2 – $C_{\text{MF005}} = 1,2 \times 10^{-5}$ М. $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ о. е.; $L = 1$ см, $T = 22$ °С.

Таким образом, все исследуемые производные ТФП образуют с ДНК два типа комплексов: интеркаляционный и внешний. Различия в механизмах комплексообразования производных MF004, MF005 и MF016 с молекулами ДНК обусловлено различиями в структуре данных соединений. Молекулы MF004 имеют короткие спейсеры из пяти метиленовых групп, что позволяет молекуле порфирина преимущественно интеркалировать между основаниями в структуре двухцепочечной ДНК. При этом молекула порфирина MF004, образуя довольно прочный комплекс с молекулой ДНК ($K_b = 8,7 \pm 0,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), размещается перпендикулярно оси двойной спирали двухцепочечной ДНК. Для молекулы MF005 с более длинными спейсерами из десяти метиленовых групп вследствие стерических препятствий комплексообразование по механизму интеркаляции

между основаниями ДНК затрудняется. Однако молекула MF005 может образовывать комплекс, присоединяясь к молекуле нуклеиновой кислоты по малой бороздке двухцепочечной ДНК. При этом наличие положительного заряда на молекуле MF005 способствует комплексообразованию с отрицательно заряженной поверхностью ДНК по малой бороздке. Длинные алифатические спейсеры, содержащие десять метиленовых групп, сильно уменьшают растворимость производного MF005 в буферном растворе. Поэтому для MF005 в присутствии ДНК наличие длинных спейсеров из десяти метиленовых групп также приводит к усилению комплексообразования за счет гидрофобных взаимодействий между хромофором MF005 и молекулой ДНК. Однако все эти взаимодействия значительно слабее, чем в случае комплексообразования по механизму интеркаляции. Эффективная константа комплексообразования MF005 с ДНК составляет $K_b = 1,8 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Можно предположить, что координирование металла Zn в ядро порфиринового макроцикла (MF016) создает стерические затруднения и препятствует интеркаляции молекулы между азотистыми основаниями в молекуле ДНК еще больше чем в случае соединения MF005. Молекула MF016 так же, как и MF005 может образовывать комплекс, присоединившись к молекуле нуклеиновой кислоты по отрицательно заряженной малой бороздке двухцепочечной ДНК. В результате наличия двухзарядного иона Zn^{2+} в порфириновом кольце и отсутствия двух атомов водорода в макроцикле водородные связи между молекулами порфирина и основаниями в структуре ДНК не образуются. Следовательно, взаимодействие соединения MF016 с ДНК значительно слабее, чем у двух других исследуемых производных. Эффективная константа комплексообразования MF016 с ДНК – $K_b = 1,3 \pm 0,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

3.4 Времена жизни флуоресценции комплексов производных тетрафенилпорфиринов с молекулами ДНК

Для получения дополнительной информации о типах взаимодействия и структурах комплексов производных ТФП с ДНК были измерены времена жизни

флуоресценции ($\tau_{\text{фл}}$) по кинетическим кривым флуоресценции, полученным методом однофотонного счета.

На **рисунке 3.16** представлены кинетические кривые флуоресценции растворов MF004 в ДМСО, буферном растворе и в буферном растворе в присутствии линейной формы ДНК в логарифмических координатах. По этим кинетическим кривым определяли время жизни флуоресценции с помощью программного обеспечения PicoQuant FluoFit, используя экспоненциальную модель. Было установлено, что время жизни флуоресценции MF004 в ДМСО и в буферном растворе практически не меняется – $\tau_1 = 11,0$ нс (100%) (**рисунк 3.16, а**) и $\tau_1 = 10,7$ нс (100%) (**рисунк 3.16, б**), соответственно. Тогда как при добавлении ДНК время жизни флуоресценции MF004 уменьшается $\tau_2 = 8,3$ нс (75%). Причем, обработку данных кинетической кривой флуоресценции MF004 в буферном растворе в присутствии линейной формы ДНК (**рисунк 3.16, в**) возможно осуществить, только используя биэкспоненциальную модель, что свидетельствует о наличии двух видов комплексов в растворе с различными временами жизни флуоресценции. Получены соответственно два времени жизни флуоресценции: $\tau_1 = 2,6$ нс (25%) – внешнего комплекса посредством залегания в малой бороздке ДНК и $\tau_2 = 8,3$ нс (75%) – интеркаляционного комплекса посредством встраивания лиганда между азотистыми основаниями, образующими двойную спираль. Основанием для отнесения более долгоживущего комплекса к интеркаляционному типу является описанное ранее в литературе явление образования более жесткого комплекса, защищенного от тушения посторонними примесями, что, как правило, увеличивает время жизни флуоресценции и делает его соизмеримым со временем жизни, измеренным при охлаждении раствора. Из процентного соотношения вклада в общую флуоресценцию очевидно преобладание в растворе более долго живущего интеркаляционного комплекса MF004 с ДНК, что согласуется с приведенными выше данными кругового дихроизма комплекса MF004 с хжкд-ДНК.

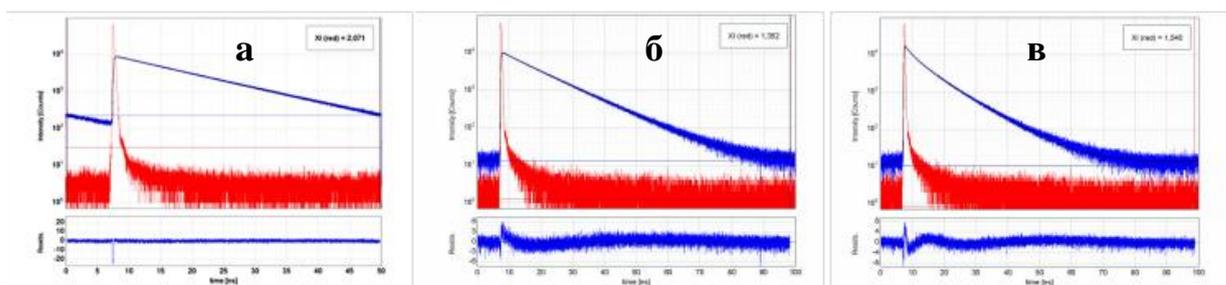


Рисунок 3.16. Кинетика затухания флуоресценции MF004 (2×10^{-5} M): **а** – в ДМСО: $\tau_1 = 11,0$ нс (100%); **б** – в фосфатном буферном растворе: $\tau_1 = 10,7$ нс (100%); **в** – в фосфатном буферном растворе в присутствии ДНК ($1,5 \times 10^{-4}$ M): $\tau_1 = 2,6$ нс (25%); $\tau_2 = 8,3$ нс (75%).

На **рисунке 3.17** представлены кинетические кривые флуоресценции растворов MF016 в ДМСО, буферном растворе и в буферном растворе в присутствии линейной формы ДНК в логарифмических координатах. Была проведена обработка этих кинетических кривых и расчет времен жизни флуоресценции аналогично MF004 с использованием экспоненциальной модели. Кинетическая кривая флуоресценции раствора MF016 в этаноле и в буферном растворе описываются моноэкспоненциальной зависимостью, и времена жизни флуоресценции не отличаются и составляют $\tau_1 = 1,8$ нс (100%) (**рисунке 3.17, а, б**), соответственно. Кинетическая кривая флуоресценции MF016 при добавлении ДНК была обработана с использованием биэкспоненциальной модели (**рисунке 3.17, в**), что свидетельствует об образовании двух типов комплексов хромофора с нуклеиновой кислотой в растворе с различными временами жизни флуоресценции. Получены, соответственно, два времени жизни флуоресценции: $\tau_1 = 1,0$ нс (80%) – внешнего комплекса посредством залегания в малой бороздке ДНК и $\tau_2 = 4,5$ нс (20%) – интеркаляционного комплекса посредством встраивания лиганда между азотистыми основаниями, образующими двойную спираль. Из процентного соотношения очевидно преобладание в растворе более короткоживущего внешнего комплекса MF016 с ДНК, что согласуется с приведенными выше данными кругового дихроизма системы MF016 с хжкд-ДНК.

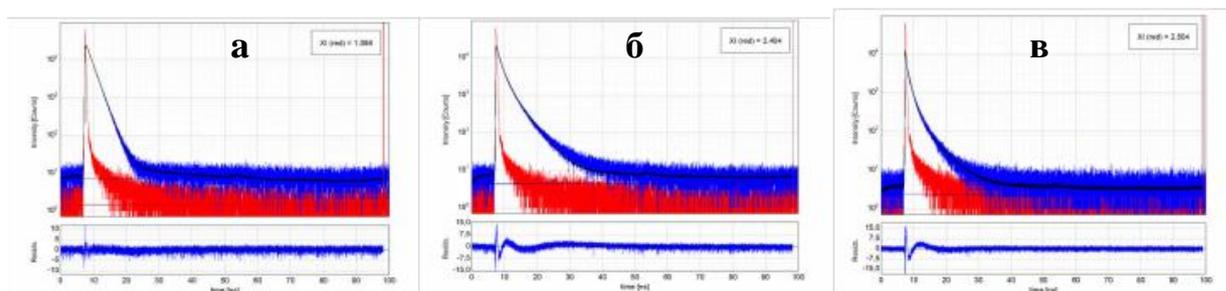


Рисунок 3.17. Кинетика затухания флуоресценции MF016 ($6,5 \times 10^{-5}$ М): **а** – в этаноле: $\tau_1 = 1,8$ нс (100%); **б** – в фосфатном буферном растворе: $\tau_1 = 1,8$ нс (100%); **в** – в фосфатном буферном растворе в присутствии ДНК ($1,5 \times 10^{-4}$ М): $\tau_1 = 1,0$ нс (80%); $\tau_2 = 4,5$ нс (20%).

На **рисунке 3.18** представлены кинетические кривые флуоресценции растворов MF005 в ДМСО, буферном растворе и в буферном растворе в присутствии линейной формы ДНК в логарифмических координатах. Кинетические кривые затухания флуоресценции были аппроксимированы при помощи экспоненциальной модели аналогично MF004 и MF016, были рассчитаны времена жизни флуоресценции. Кинетические кривые флуоресценции раствора MF005 в ДМСО (**рисунке 3.18, а**) и в буферном растворе (**рисунке 3.18, б**) описываются моноэкспоненциальной зависимостью, и времена жизни флуоресценции составляют $\tau_1 = 10,5$ нс (100%) и $\tau_1 = 9,0$ нс (100%), соответственно.

Кинетическая кривая флуоресценции MF005 при добавлении ДНК также была обработана с использованием биэкспоненциальной модели (**рисунке 3.18, в**), что в данном случае свидетельствует об образовании двух типов комплексов хромофора с нуклеиновой кислотой в растворе с различными временами жизни флуоресценции. Для данного раствора получены два времени жизни флуоресценции: $\tau_1 = 0,9$ нс (38%) – внешнего комплекса посредством залегания в малой бороздке ДНК и $\tau_2 = 5,4$ нс (62%) – интеркаляционного комплекса посредством встраивания лиганда между азотистыми основаниями, образующими двойную спираль. Из процентного соотношения можно сделать вывод о примерно одинаковом вкладе в общую флуоресценцию как внешнего, так и интеркаляционного комплексов MF005 с ДНК, что согласуется с

приведенными выше данными кругового дихроизма комплекса MF005 с хжкд-ДНК.

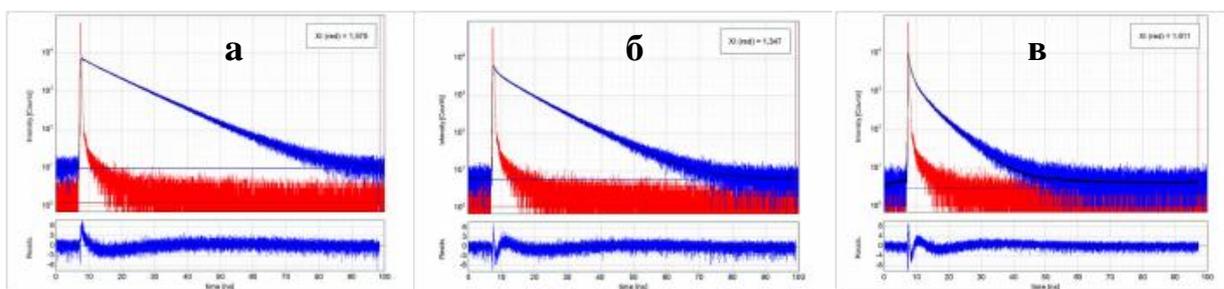


Рисунок 3.18. Кинетика затухания флуоресценции MF005 ($2,5 \times 10^{-5}$ М): **а** – в ДМСО: $\tau_1 = 10,5$ нс (100%); **б** – в фосфатном буферном растворе $\tau_1 = 9,0$ нс (100%); **в** – в фосфатном буферном растворе в присутствии ДНК ($1,5 \times 10^{-4}$ М): $\tau_1 = 0,9$ нс (38%); $\tau_2 = 5,4$ нс (62%).

Полученные времена жизни флуоресценции ТФП в различных растворителях и в комплексах с ДНК сведены в **таблице 3.2**.

Таблица 3.2. Изменение времени жизни флуоресценции производных ТФП в зависимости от растворителя.

Состав раствора	$\lambda_{\text{возб}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{изм}}, \text{нм}$	$\tau_{\text{фл}}, \text{нс}$
MF004 (CH ₂) ₅ в ДМСО	440	656	11,0 (100%)
MF004 (CH ₂) ₅ в буфере	440	656	10,7 (100%)
MF004 (CH ₂) ₅ и ДНК в буфере	440	656	2,6 (25%) 8,3 (75%)
MF005 (CH ₂) ₁₀ в ДМСО	440	656	10,5 (100%)
MF005 (CH ₂) ₁₀ в буфере	440	656	9,0 (100%)
MF005 (CH ₂) ₁₀ и ДНК в буфере	440	656	0,9 (38%) 5,4 (62%)
MF016 Zn(CH ₂) ₁₀ в EtOH	440	608	1,8 (100%)
MF016 Zn(CH ₂) ₁₀ в буфере	440	608	1,8 (100%)
MF016 Zn(CH ₂) ₁₀ и ДНК в буфере	440	656	1,0 (80%) 4,5 (20%)

Ошибка измерения не превышала 2%

Переход от моноэкспоненциальных кривых затухания флуоресценции к биэкспоненциальным при добавлении ДНК ко всем исследуемым ТФП подтверждает данные об образовании двух типов комплексов порфиринов с ДНК (интеркаляционный и внешний, в малой бороздке), что согласуется с данными полученными структурным методом КД в параграфе 3.3. Компонента, характеризующаяся более долгим временем жизни флуоресценции,

соответствует интеркаляции ТФП между основаниями нуклеиновой кислоты, тогда как более короткоживущая компонента относится к комплексу залегания порфирина по малой бороздке ДНК. Вклады компонент в процентах были посчитаны по формуле 3.5:

$$x_i = \frac{A_i}{A_1 + A_2} \times 100\% \quad (3.5)$$

На основании рассчитанных вкладов компонент кривых затухания флуоресценции подтверждено преимущественное (75%) образование интеркаляционного типа комплекса между ДНК и ТФП MF004 с наименее объемными спейсерами из пяти CH_2 -групп с характерным временем жизни флуоресценции $8,3 \pm 0,05$ нс. В случае ТФП MF016, несущего объемные спейсеры из десяти CH_2 -групп в купе с координированным в макроцикле металлом Zn, наблюдалось преимущественное (80%) образование внешнего типа комплекса с ДНК с характерным временем жизни флуоресценции $1,0 \pm 0,03$ нс. ТФП MF005, структура которого представляет собой безметалльный аналог MF016, образует с ДНК интеркаляционный и внешний типы комплексов примерно в одинаковом соотношении, которые характеризуются временами жизни флуоресценции $5,4 \pm 0,09$ нс и $0,9 \pm 0,03$ нс, соответственно.

Заключение

Исследованы комплексы трех новых синтетических катионных тетрафенилпорфиринов с ДНК. Обнаружена корреляция константы связывания исследованных порфириновых производных с ДНК и структуры данных порфиринов. Наличие длинных боковых цепей из десяти CH_2 -групп в порфириновом кольце препятствует связыванию красителя с ДНК и уменьшает константу связывания почти на порядок ($K_b = 1,8 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) относительно константы связывания для соединения с боковыми цепями из пяти CH_2 -групп ($K_b = 8,7 \pm 0,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Координирование объемного металла в структуре порфиринового макроцикла также уменьшает константу связывания исследуемого порфиринового производного с боковыми цепями из десяти CH_2 -

групп ($K_b = 1,3 \pm 0,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Комплексообразование исследуемых ТФП с ДНК было подтверждено методом кругового дихроизма. На основании сравнительного анализа спектров КД системы ТФП и хжкд-ДНК, а также времен жизни флуоресценции ТФП в растворителях и в комплексе с ДНК был сделан вывод о том, что исследуемые ТФП могут образовывать два типа комплексов с ДНК: интеркаляционный (встраивание между основаниями ДНК) и внешний (присоединение по малой бороздке ДНК). ТФП в составе интеркаляционного комплекса с ДНК имеет более длительное время жизни флуоресценции по сравнению с ТФП в составе внешнего комплекса ДНК.

Глава 4. Исследование комплексов красителя цианинового ряда SYBRGreen I с ДНК

Краситель SYBRGreen I (SG) широко применяется в качестве флуоресцентного детектора молекул ДНК в биохимических и биомедицинских исследованиях [63-65]. Был рассчитан квантовый выход флуоресценции красителя SG комплексе с ДНК, который оказался весьма высоким ($\Phi_f = 0,69$) по сравнению с выходом красителя в растворе, который близок к нулю [131]. Это обуславливает увеличение флуоресценции красителя при комплексообразовании с ДНК в > 1000 раз.

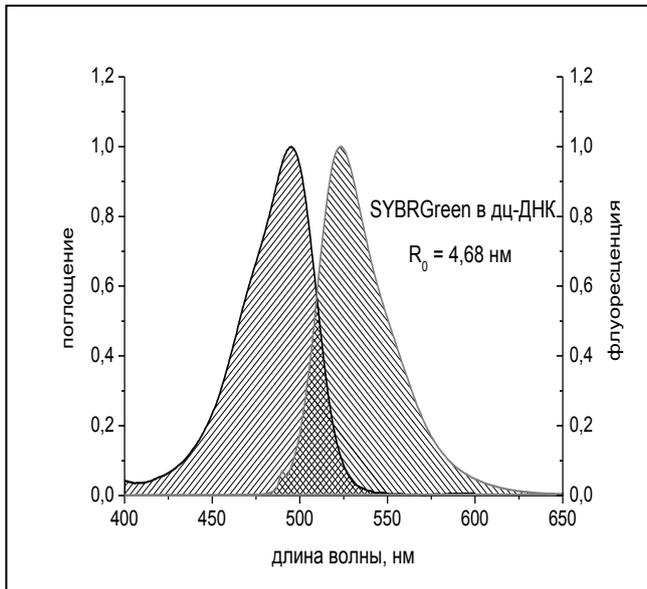


Рисунок 4.1. Спектры поглощения и флуоресценции красителя SG в комплексе с двухцепочечной ДНК. Спектр флуоресценции зарегистрирован при длине волны возбуждения 490 нм. Заштрихованная область показывает перекрывание спектров поглощения и флуоресценции красителя.

Краситель SG имеет небольшой Стоксов сдвиг (≈ 30 нм), что обуславливает перекрывание спектров поглощения и флуоресценции красителя (рисунок 4.1) и при повышении его концентрации приводит к сближению молекул красителя в образце на достаточное расстояние для осуществления переноса энергии по механизму homo-FRET. Для исследуемой пары SG-SG был рассчитан ферстеровский радиус – 4,68 нм [131].

4.1 Концентрационное тушение красителя SYBRGreen I в комплексе с ДНК в растворе и в составе жидкокристаллических дисперсий ДНК

При смешивании красителя SG с дц-ДНК в буферном растворе (pH 7) происходит сильное увеличение квантового выхода флуоресценции SG, которое

обусловлено образованием жестких интеркаляционных комплексов красителя с молекулами дц-ДНК. При увеличении концентрации SG в растворе дц-ДНК наблюдается пропорциональное увеличение флуоресценции до концентрации красителя 4×10^{-6} М, после которой зависимость интенсивности флуоресценции отклоняется от линейной, что, вероятно, обусловлено процессом насыщения молекул ДНК молекулами красителя (рисунок 4.2, ромб), а не процессами самотушения [131].

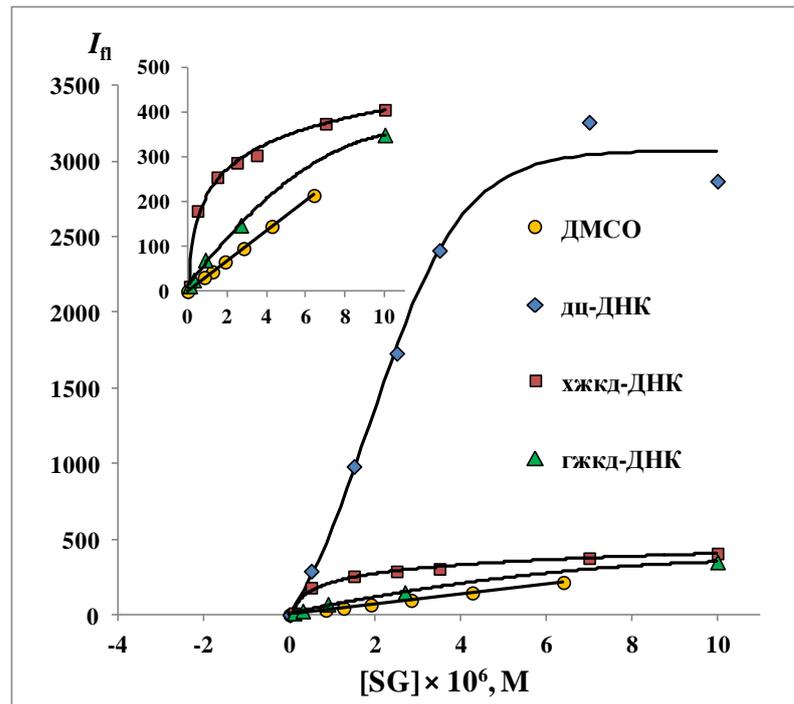


Рисунок 4.2. Зависимости интенсивности флуоресценции красителя SG от его концентрации: круг – в растворе ДМСО; ромб – в растворе дц-ДНК; квадрат – в хжкд-ДНК; треугольник – в гжкд-ДНК; [ДНК] = $1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.

В качестве контроля было проведено флуоресцентное титрование SG в растворе ДМСО и обнаружено отсутствие концентрационного тушения красителя, как и в комплексе с дц-ДНК в буферном растворе. Наблюдаемое возрастание интенсивности флуоресценции при увеличении количества SG в том же диапазоне концентраций, что и для комплексов с дц-ДНК, является линейным (рисунок 4.2, круг). Интенсивность флуоресценции красителя в ДМСО на порядок меньше, чем интенсивность флуоресценции SG в дц-ДНК, что вероятно обусловлено возможностью свободного вращения красителя в растворителе и,

соответственно, высокой скоростью безызлучательной диссипации энергии возбужденных состояний красителя [64].

При взаимодействии красителя SG с молекулярно организованными системами на основе ДНК, такими как холестерическая и гексагональная жкд-ДНК, наблюдается нелинейное возрастание интенсивности флуоресценции при увеличении количества SG, начиная с очень низких концентраций красителя (5×10^{-7} М) (**рисунок 4.2, квадрат и треугольник**). Интенсивность флуоресценции красителя в системах жкд-ДНК примерно на порядок меньше, чем интенсивность флуоресценции SG в дц-ДНК (**рисунок 4.2, ромб**) [131]. Нелинейность данных зависимостей и низкие интенсивности флуоресценции для комплексов SG с хжкд-ДНК и с гжкд-ДНК при концентрациях красителя в том же диапазоне, что и для экспериментов с дц-ДНК, могут свидетельствовать о наличии эффективного самотушения красителя SG. Расстояние между квазинематическими слоями при переходе от хжкд-ДНК к гжкд-ДНК сокращается от $d \approx 3,4$ нм до $d \approx 2,6$ нм, соответственно, обуславливая увеличение плотности упаковки молекул ДНК в структуре [68]. Уменьшение интенсивности флуоресценции при увеличении концентрации SG в гексагональной структуре происходит более эффективно, чем в холестерической структуре, в силу более компактной организованной структуры молекул ДНК в составе гжкд-ДНК по сравнению с хжкд-ДНК (**рисунок 4.2, квадрат и треугольник, соответственно**).

Таким образом, непропорциональное возрастание флуоресценции красителя с увеличением количества красителя в различных системах на основе дц-ДНК, очевидно, свидетельствует о наличии процессов самотушения (концентрационного тушения) флуоресценции SG, которое проявляется более эффективно при более плотной упаковке в гексагональной системе, по сравнению с холестерической системой и свободным расположением молекул дц-ДНК в растворе. В органическом растворителе ДМСО самотушение SG в исследуемом диапазоне концентраций ($(0,05-10) \times 10^{-6}$ М) не проявляется [131].

4.2 Деполяризация флуоресценции красителя SYBRGreen I – доказательство миграции энергии между мономерами красителя, интеркалированными в ДНК

Миграция энергии или перенос энергии по механизму homo-FRET между одинаковыми хромофорами SG также может происходить в системах на основе ДНК, описанных в параграфе 4.1. Для осуществления резонансного переноса энергии критическими параметрами являются: перекрывание спектров поглощения и флуоресценции акцептора и донора, соответственно, и расстояние между донором и акцептором. При условии, что первое условие выполняется, как отмечено выше, в комплексах SG с ДНК может обеспечиваться достаточно близкое расположение хромофоров друг к другу с увеличением концентрации красителя, приводя к миграции энергии.

Известно, что при осуществлении переноса энергии между одинаковыми молекулами или миграции энергии происходит деполяризация флуоресценции возбужденных молекул [58, 132, 133], таким образом, позволяя использовать измерения анизотропии флуоресценции для выявления и доказательства осуществления процесса homo-FRET.

Уменьшение анизотропии флуоресценции SG наблюдалось при добавлении увеличивающихся концентраций красителя как к раствору дц-ДНК, так и к дц-ДНК в составе упорядоченных структур жкд-ДНК, что является доказательством осуществления переноса энергии по механизму homo-FRET в обеих системах (**рисунок 4.3, А, Б**). В жкд-ДНК эффект деполяризации проявляется более ярко (**рисунок 4.3, красный квадрат и зеленый треугольник**), чем в растворе дц-ДНК (**рисунок 4.3, синий ромб**), что объясняется более высокими локальными концентрациями красителя SG в молекулярно организованных структурах, а, соответственно, уменьшением расстояния между молекулами, в результате чего миграция энергии между молекулами SG становится более эффективной.

Зависимости анизотропии флуоресценции (r) красителя SG от его концентрации в логарифмической шкале представляют собой сигмоидные

кривые (рисунок 4.3, Б), которые имеют плато при малых концентрациях красителя $(0,5-1) \times 10^{-7}$ М, при которых расстояние между молекулами SG еще не достаточно близкое для осуществления переноса энергии.

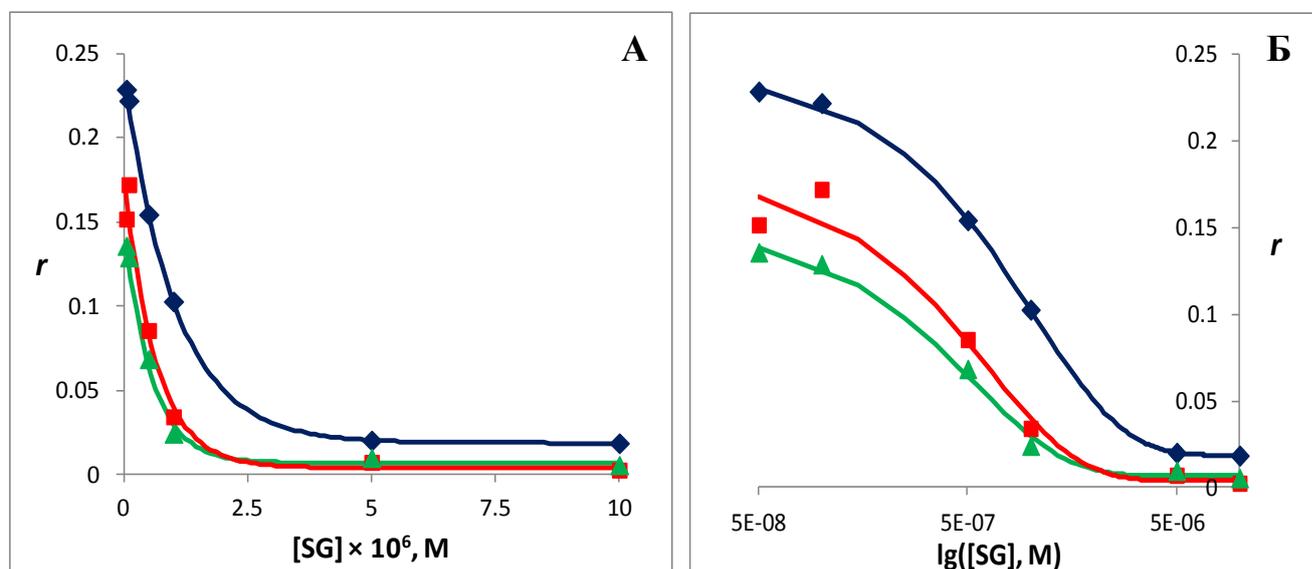


Рисунок 4.3. А – Зависимость анизотропии флуоресценции красителя SG от его концентрации в растворе дц-ДНК (синий ромб), жкд-ДНК (красный квадрат) и гжкд-ДНК (зеленый треугольник), $[\text{ДНК}] = 1,5 \times 10^{-5}$ М п. о. Б – Та же зависимость с осью абсцисс, представленной в логарифмических координатах.

Миграция энергии между мономерами SG в комплексе с дц-ДНК, как в составе жкд-ДНК, так и в растворе, была подтверждена уменьшением анизотропии флуоресценции хромофора.

4.3 Анализ времен жизни флуоресценции красителя SYBRGreen I при концентрационном тушении в присутствии ДНК в растворе и в составе упорядоченных структур жидкокристаллических дисперсий

Для получения дополнительной информации о поведении красителя SG в различных системах (ДМСО, дц-ДНК, жкд-ДНК), описанных в параграфе 4.1 и 4.2, были измерены времена жизни флуоресценции (таблицы 4.1, 4.2).

Показано, что даже при самой большой концентрации SG в ДМСО (1×10^{-5} М) самотушение красителя не наблюдается, при этом время жизни флуоресценции SG остается неизменным в большом интервале концентраций ($3,3 \pm 0,15$ нс, (таблица 4.1) [131]). В водно-солевом буферном растворе время жизни флуоресценции красителя SG не удалось зафиксировать в наносекундном

диапазоне, что согласуется с литературными данными, в соответствии с которыми оно составляет ~ 3 пс в Трис-ЭДТА буферном растворе [64]. Однако при комплексообразовании красителя SG с дц-ДНК наблюдается возрастание времени жизни флуоресценции до $\tau = 5,5 \pm 0,23$ нс (таблица 4.1) [131]. При добавлении увеличивающихся концентраций SG в раствор дц-ДНК время жизни флуоресценции остается постоянным и кинетики затухания флуоресценции следуют моноэкспоненциальному закону (рисунок 4.4).

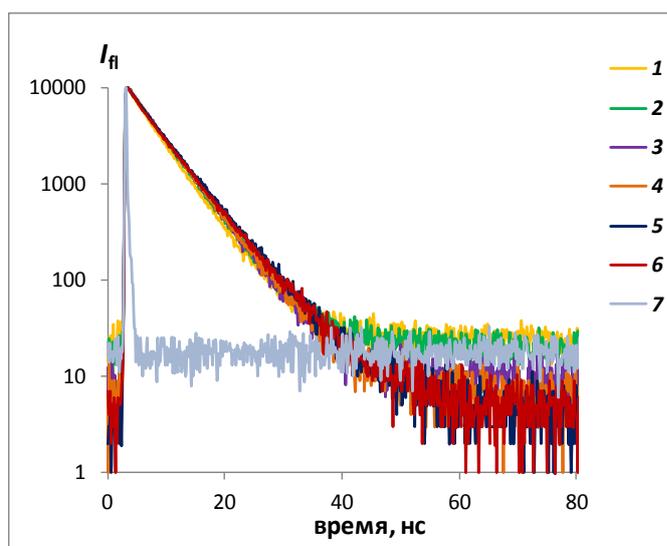


Рисунок 4.4. Кривые затухания флуоресценции красителя SG (5×10^{-8} (1); 1×10^{-7} (2); 5×10^{-7} (3); 1×10^{-6} (4); 5×10^{-6} (5); 1×10^{-5} (6) М, IRF (7)) в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.). Ось ординат – в логарифмических координатах.

Моноэкспоненциальные кинетики затухания флуоресценции вкупе с наблюдаемым постоянством времен жизни флуоресценции и уменьшением квантового выхода флуоресценции позволяют заключить о том, что эффект тушения флуоресценции с увеличением концентрации красителя в растворе дц-ДНК наиболее вероятно связан с насыщением молекул ДНК молекулами SG. После достижения молекулами красителя максимального уровня заполнения ДНК избыточное количество красителя может оставаться в буферном растворе в свободном или агрегированном состоянии и, соответственно, не вносит вклад в интенсивность флуоресценции [64] или образовывать нефлуоресцирующие димеры или агрегаты в малой бороздке ДНК [59, 60].

Таблица 4.1. Времена жизни красителя SG в свободном состоянии в ДМСО и в комплексе с молекулами дц-ДНК, $[ДНК]=3 \times 10^{-5}$ М п. о.

[SG], М	$\tau_{\text{фл}}, \text{нс}$ дц-ДНК	$\tau_{\text{фл}}, \text{нс}$ ДМСО
5×10^{-8}	5,5	-
1×10^{-7}	5,1	
5×10^{-7}	5,2	3,1
1×10^{-6}	5,3	3,5
5×10^{-6}	5,7	
1×10^{-5}	5,6	

Ошибка измерения не превышала 5%.

Время жизни флуоресценции SG при переходе от раствора дц-ДНК к системам хжкд-ДНК и гжкд-ДНК уменьшается с увеличением концентрации красителя от 5,5 до 3,4 и 1,8 нс, соответственно, при этом сохраняется моноэкспоненциальный характер кинетических кривых затухания флуоресценции (таблица 4.2 [131], рисунок 4.5, А, Б).

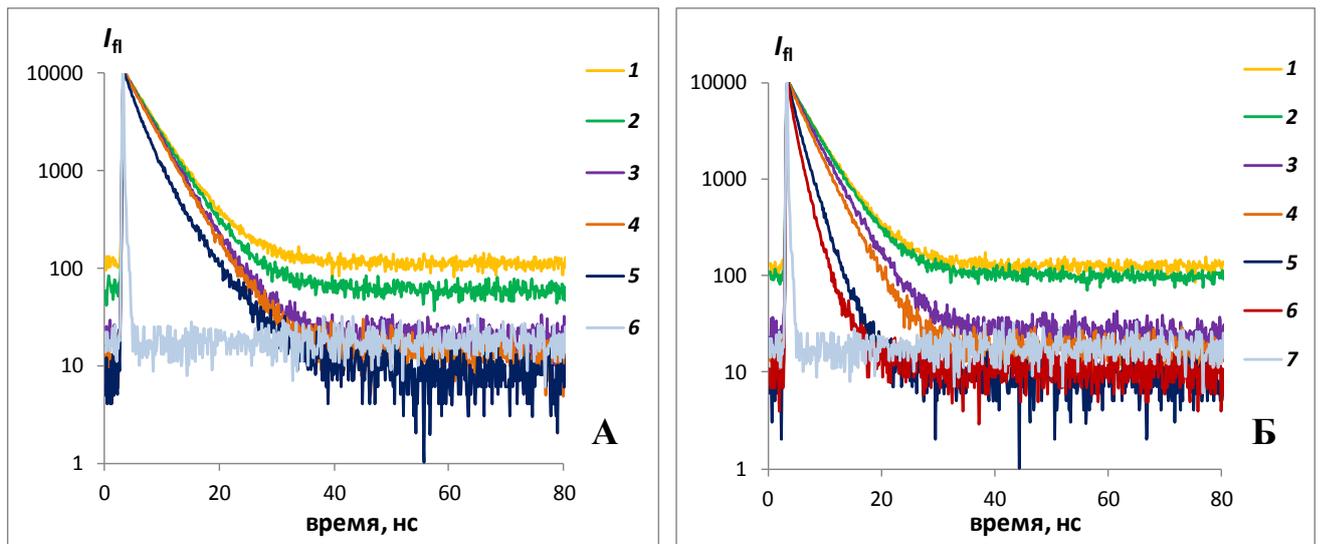


Рисунок 4.5. Кривые затухания флуоресценции красителя SG (5×10^{-8} (1); 1×10^{-7} (2); 5×10^{-7} (3); 1×10^{-6} (4); 5×10^{-6} (5) М, IRF (6)) в комплексе с хжкд-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) – (А). Кривые затухания флуоресценции красителя SG (5×10^{-8} (1); 1×10^{-7} (2); 5×10^{-7} (3); 1×10^{-6} (4); 5×10^{-6} (5); 1×10^{-5} (6) М, IRF (7)) в комплексе с гжкд-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) – (Б). Оси ординат – в логарифмических координатах.

Уменьшение времени жизни флуоресценции красителя при увеличении его концентрации в упорядоченных структурах на основе ДНК является признаком

процесса самотушения SG в описанных системах наряду с непропорциональным увеличением квантового выхода флуоресценции.

Таблица 4.2. Времена жизни флуоресценции SG в комплексе с ДНК в составе холестерической и гексагональной жкд-ДНК, $[ДНК]=1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.

[SG], М	$\tau_{\text{фл, нс}}$ холестерическая жкд-ДНК	$\tau_{\text{фл, нс}}$ гексагональная жкд-ДНК
5×10^{-8}	4,6	4,3
1×10^{-7}	4,5	4,3
5×10^{-7}	4,2	3,9
1×10^{-6}	4,1	3,5
5×10^{-6}	3,4	2,2
1×10^{-5}	-	1,8

Ошибка измерения не превышала 5%.

Резкое уменьшение квантового выхода и времени жизни флуоресценции интеркалированного красителя SG при переходе от дц-ДНК к жкд-ДНК системам может быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, окружение молекулы интеркалированного в дц-ДНК красителя – это водный буферный раствор с диэлектрической постоянной воды ($\epsilon = 81$). Окружение красителя в жкд-ДНК и гжкд-ДНК – это квазинематические слои ДНК и высококонцентрированный раствор ПЭГ, и локальная диэлектрическая постоянная для этих систем существенно ниже, кроме того, в этих системах сильно различаются и коэффициенты преломления [69, 114]. Во-вторых, увеличение концентрации красителя обеспечивает достаточно близкое расположение молекул SG друг относительно друга, что дает возможность реализации процесса переноса энергии по механизму FRET.

В литературе описано несколько механизмов концентрационного тушения, такие как образование нефлуоресцирующих димеров, перенос энергии на нефлуоресцирующие димеры, образование эксимеров и др. [134, 135]. В исследуемой системе наиболее вероятным механизмом является перенос энергии с мономера SG в возбужденном состоянии на нефлуоресцирующий димер или агрегат красителя (FRET). Кроме того, перенос энергии на нефлуоресцирующий димер/агрегат может происходить как от непосредственно возбужденного

мономера, так и от мономера, получившего энергию от другого мономера в результате миграции возбуждения (homo-FRET) [136, 137]. Данный механизм тушения может осуществляться, поскольку в молекулярно организованных жкд-ДНК системах создаются более высокие локальные концентрации SG, превышающие соответствующие концентрации в гомогенных растворах на несколько порядков, что увеличивает вероятность образования димеров и агрегатов SG на ДНК между квазинематическими слоями жкд-ДНК [59, 60].

Итак, самотушение красителя SG в упорядоченных системах жкд-ДНК было подтверждено уменьшением времен жизни флуоресценции красителя с увеличением его концентрации в указанных системах. В качестве механизма данного процесса предложен резонансный перенос энергии между флуоресцирующим мономером красителя и нефлуоресцирующим ассоциатом красителя (FRET), вероятно, образующимся на матрице ДНК при высоких локальных концентрациях SG, которые создаются в компактных структурах жкд-ДНК. Изменение характеристик среды при переходе от раствора дц-ДНК к упорядоченным жкд-ДНК системам также может вносить вклад в процессы самотушения красителя. На основании постоянства времен жизни флуоресценции SG был сделан вывод, об отсутствии самотушения красителя в системе дц-ДНК в растворе, и нелинейность зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации SG в данном случае приписывается процессам насыщения молекул ДНК молекулами красителя.

4.4 Исследование комплексообразования красителя SYBRGreen I с ДНК в составе холестерической жидкокристаллической дисперсии методом кругового дихроизма

Тип комплексов, которые образует краситель SG с ДНК, определяли методом кругового дихроизма, пользуясь теорией оптических свойств жидкокристаллических дисперсий на основе ДНК [68].

При добавлении к жкд-ДНК красителя SG в спектре КД образуется полоса индуцированного КД красителя при $\lambda = 496$ нм, которая имеет

одинаковый (-) знак с полосой, соответствующей поглощению азотистых оснований ДНК, при $\lambda = 270$ нм, что говорит о комплексообразовании и интеркаляционном типе образующегося комплекса, а также подтверждает ранее известные данные. Однако при высоких концентрациях SG $(1-4) \times 10^{-6}$ М наблюдается появление дополнительной индуцированной полосы $\lambda = 535$ нм, которая имеет противоположный знак и соответствует красителю, образующему с хжкд-ДНК внешний комплекс (**рисунок 4.6**). Дополнительная полоса $\lambda = 535$ нм отсутствует при малых концентрациях красителя вплоть до $(2-3) \times 10^{-7}$ М, что объясняется более высокой константой комплексообразования красителя с ДНК при интеркаляции, чем при образовании внешнего комплекса в малой бороздке ДНК [131]. Внешний комплекс может представлять собой мономер SG, залегающий в малой бороздке ДНК или нефлуоресцирующий димер или агрегат, как описано для цианиновых красителей в литературе [59, 60]. Однако образование второго типа комплекса мономерной формы красителя с ДНК должно было бы характеризоваться появлением второй компоненты в кривых затухания флуоресценции. А поскольку для всех систем сохранялся моноэкспоненциальный характер этих кривых (**рисунки 4.4, 4.5**), то можно предположить, что SG образует нефлуоресцирующий ассоциат в малой бороздке.

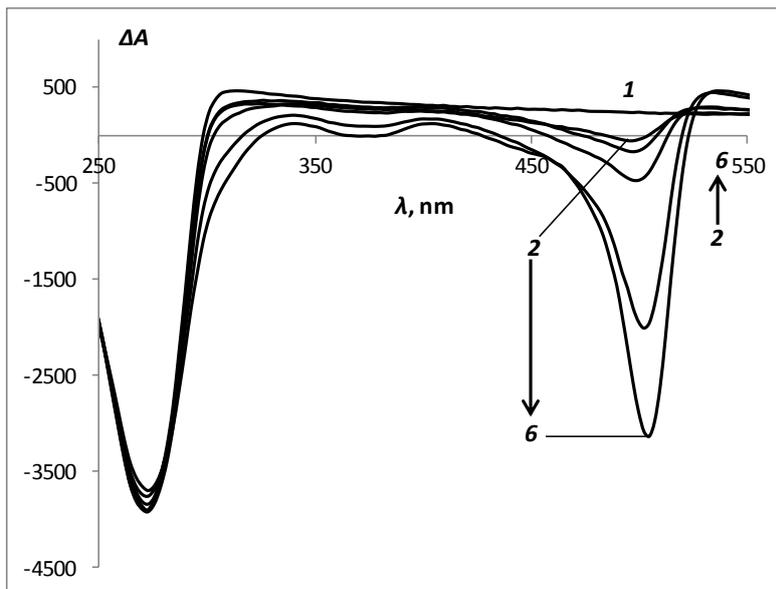


Рисунок 4.6. Спектры кругового дихроизма красителя SG (0 (**1**); 2×10^{-7} (**2**); 4×10^{-7} (**3**); 8×10^{-7} (**4**); 2×10^{-6} (**5**); 4×10^{-6} (**6**) М) в комплексе с хжкд-ДНК ($[ДНК] = 3 \times 10^{-5}$ М), $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^6$ о. е.; $L = 1$ см, $t_{нак} = 4,8$ сек, шаг развертки спектра 2,6 нм.

Образование ассоциата SG при высоких концентрациях красителя обуславливает процесс самогашения флуоресценции SG в жидкокристаллических структурах ДНК. Поскольку расстояние между флуоресцирующими мономерами SG (донор энергии) и его нефлуоресцирующими ассоциатами (акцептор энергии) сокращается в результате плотной упаковки молекул ДНК в составе жкд-ДНК, становится возможным осуществление эффективного переноса энергии по механизму hetero-FRET.

Таким образом, структурным методом кругового дихроизма впервые доказана способность красителя SG образовывать больше одного типа комплексов с дц-ДНК: интеркаляционный, при малых концентрациях красителя, и внешний комплекс в малой бороздке ДНК, при высоких уровнях заполнения нуклеиновой кислоты, который может представлять собой ассоциат красителя.

4.5 Исследование образования ассоциатов красителя SYBRGreen I на матрице ДНК методом спектрофотометрии

В литературе описано образование димеров и агрегатов цианиновых красителей на ДНК, однако для красителя SG подобные исследования ранее не проводились. В данной работе образование ассоциатов (димеров/агрегатов) красителя SG на матрице ДНК было изучено по спектрам поглощения.

Спектр поглощения комплекса SG с ДНК имеет максимум при $\lambda = 495$ нм (**рисунок 4.7, 1–3**), который сдвигается в коротковолновую область при добавлении более высоких концентраций красителя ($> 1 \times 10^{-6}$ М, **рисунок 4.7, 4–7**). Одновременно с гипсохромным сдвигом (~ 3 нм) основного максимума в спектре появляется и растет дополнительная полоса при $\lambda \sim 480$ нм (**рисунок 4.7, 4–7**), что свидетельствует об образовании ассоциата SG, который, наиболее вероятно, представляет собой H-димер [59, 60, 62, 138].

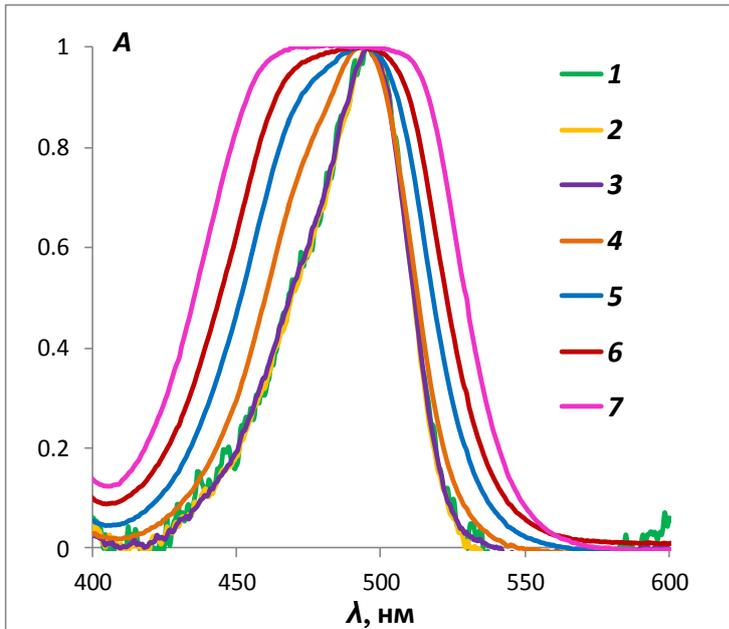


Рисунок 4.7. Нормализованные спектры поглощения красителя SG (1×10^{-7} (1); 5×10^{-7} (2); 1×10^{-6} (3); 5×10^{-6} (4); 1×10^{-5} (5); $1,5 \times 10^{-5}$ (6); $2,4 \times 10^{-5}$ (7) М) в присутствии дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.).

Сравнение спектров поглощения одной и той же концентрации красителя SG в ДМСО (мономерная форма, $\lambda_{\text{макс}} = 497$ нм, **рисунок 4.8, 1**), в комплексе с ДНК и в буферном растворе также подтвердило образование ассоциата красителя как в буферном растворе (уменьшение оптической плотности, сдвиг максимума в коротковолновую область $\lambda_{\text{макс}} = 493$ нм и появление дополнительной полосы при $\lambda \sim 480$ нм, **рисунок 4.8, 3**), так и в среде биомакромолекулы (те же эффекты, но выражены менее ярко, **рисунок 4.8, 2**).

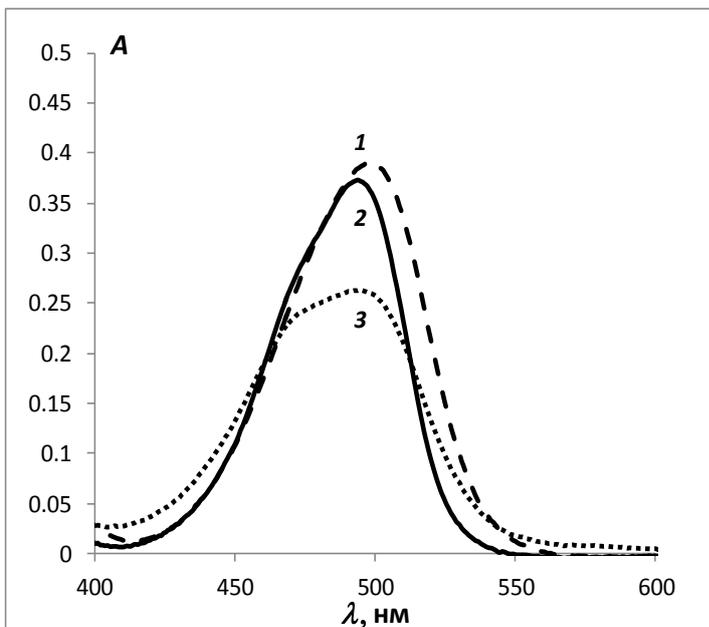


Рисунок 4.8. Спектры поглощения красителя SG (5×10^{-6} ; М) в ДМСО (1), в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) (2) и в буферном растворе (1×10^{-2} М NaH_2PO_4 , 0,3 М NaCl , pH 7) (3).

Согласно теории экситона образующийся ассоциат имеет H-геометрию. А поскольку не наблюдается отдельной узкой полосы в коротковолновой области спектра, характерной для H-агрегатов, то молекулярный ассоциат, наиболее вероятно, представляет собой H-димер [138].

При добавлении увеличивающихся концентраций SG в системы жкд-ДНК, как холестерическую, так и гексагональную, наблюдались изменения спектров поглощения аналогичные изменениям в растворе дц-ДНК (**рисунок 4.7**). Однако в жкд-ДНК системах расстояние между флуоресцирующими мономерами SG и нефлуоресцирующими ассоциатами сокращается за счет компактной упаковки молекул ДНК в квазинематических слоях, что обеспечивает возможность осуществления процесса переноса энергии hetero-FRET, как предложено ранее.

Методом спектрофотометрии показано образование ассоциатов красителя SG на матрице ДНК, которые, вероятно, образуются в малой бороздке ДНК. Предполагается, что данные ассоциаты имеют H-геометрию, что, однако, требует дополнительных исследований.

Заключение

Исследовано поведение красителя SG в различных системах, таких как ДМСО, раствор дц-ДНК, молекулярно организованные структуры жкд-ДНК. Обнаружено самотушение красителя SG в упорядоченных структурах дисперсий на основе дц-ДНК, которое проявляется более эффективно при более плотной упаковке в гексагональной системе, по сравнению с холестерической. В ДМСО и растворе дц-ДНК самотушение SG не проявляется в исследуемом диапазоне концентраций $((0,05-10) \times 10^{-6} \text{ M})$. В качестве механизма самотушения предложен резонансный перенос энергии (hetero-FRET) с возбужденного состояния интеркалированного в ДНК мономера SG на его нефлуоресцирующий ассоциат, образующийся в малой бороздке ДНК при высоких локальных концентрациях красителя, которые создаются между квазинематическими слоями жкд-ДНК.

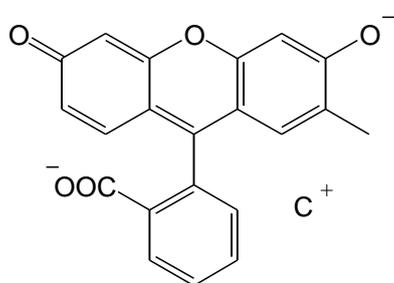
Подтверждено наличие резонансного переноса энергии между мономерами SG в комплексе с дц-ДНК по механизму homo-FRET, как в составе жкд-ДНК, так и в растворе. Миграция энергии между мономерами SG (homo-FRET) не вызывает непосредственно самотушение красителя (дц-ДНК в растворе), однако может увеличивать эффективность переноса энергии с мономера SG на ассоциат SG по механизму hetero-FRET (жкд-ДНК системы) [136, 137].

Глава 5. Взаимодействие наночастиц золота с комплексами красителя SYBRGreen I и ДНК

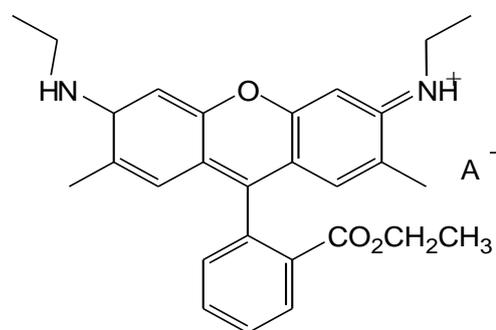
Системы флуорофор-тушитель, включающие НЧ благородных металлов в качестве тушителя и молекулы органического красителя, выступающие флуоресцентными метками, получили большое распространение в биофотонике в последнее время. Поскольку золотые НЧ способны эффективно тушить флуоресценцию и биолюминесценцию находящихся рядом органических молекул, это свойство НЧ золота может служить основой для разработки различных методов биодетекции в биохимических и биомедицинских исследованиях, а также применяться в биосенсорике [105, 106].

5.1 Тушение флуоресценции органических красителей наночастицами золота на матрице ДНК

В параграфе 5.1 рассматривается тушение флуоресценции органических красителей наночастицами золота ($d \sim 2,5$ нм) в буферном растворе.



Флуоресцеин



Родамин 6Ж

Широко известные флуорофоры родамин 6Ж и флуоресцеин были выбраны для данного исследования, поскольку они имеют схожую гетероциклическую структуру в основе, а отличаются только заместителями и обусловленным ими зарядом. Флуоресцеин присутствует в растворе в виде дианиона при нейтральном значении pH, тогда как родамин 6Ж несет один положительный заряд при $\text{pH} = 7$ [139], что позволит определить роль заряда при взаимодействии красителя с НЧ золота. Данные красители были выбраны для исследования в буферном растворе, так как они обладают высокими квантовыми

выходами флуоресценции, 0,92 и 0,95 для флуоресцеина и родамина, соответственно, тогда как краситель SG, например, практически не флуоресцирует в отсутствие ДНК в буферном растворе.

Показано, что при взаимодействии НЧ золота с положительно заряженным красителем родамином 6Ж происходит эффективное тушение флуоресценции уже при двукратном молярном избытке НЧ относительно красителя (**рисунок 5.1, А**). Однако флуоресценция отрицательно заряженного флуоресцеина тушится гораздо менее эффективно (**рисунок 5.1, Б**).

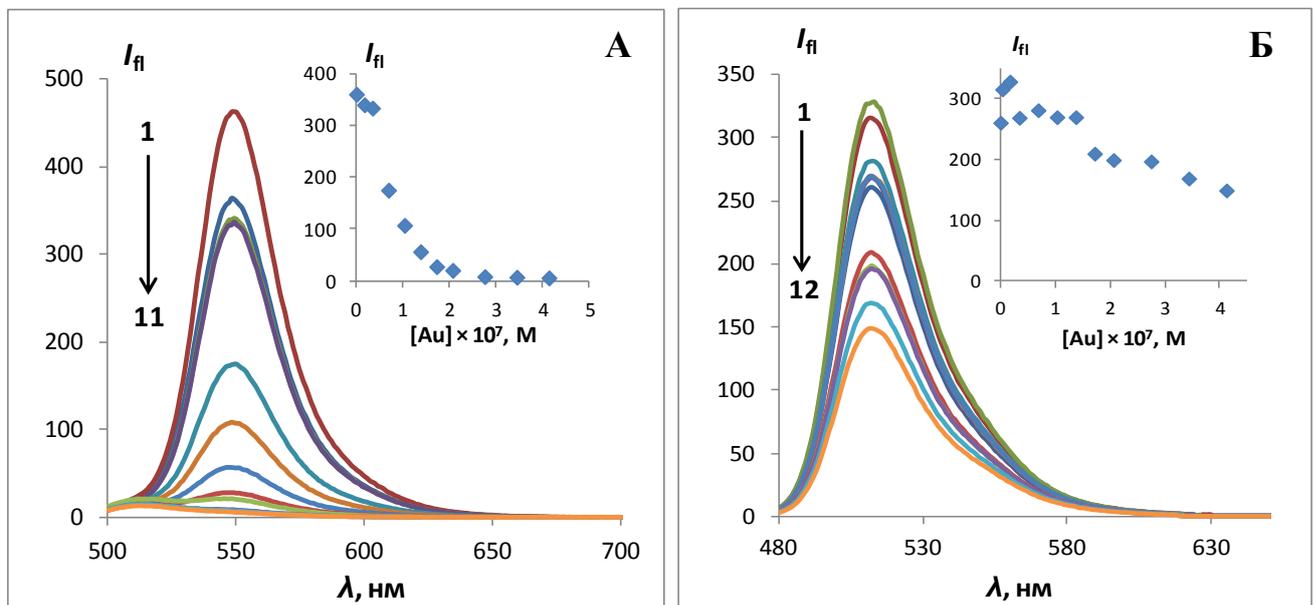


Рисунок 5.1. Спектры флуоресценции **А** – красителя родамин 6Ж (1×10^{-7} М) при титровании НЧ золота: 0 (1); $1,72 \times 10^{-8}$ (2); $3,43 \times 10^{-8}$ (3); $6,87 \times 10^{-8}$ (4); $1,03 \times 10^{-7}$ (5); $1,37 \times 10^{-7}$ (6); $1,72 \times 10^{-7}$ (7); $2,06 \times 10^{-7}$ (8); $2,75 \times 10^{-7}$ (9); $3,43 \times 10^{-7}$ (10); $4,12 \times 10^{-7}$ (11) М; **Б** – красителя флуоресцеин (1×10^{-7} М) при титровании НЧ золота: 0 (1); $3,43 \times 10^{-9}$ (2); $1,72 \times 10^{-8}$ (3); $3,43 \times 10^{-8}$ (4); $6,87 \times 10^{-8}$ (5); $1,03 \times 10^{-7}$ (6); $1,37 \times 10^{-7}$ (7); $1,72 \times 10^{-7}$ (8); $2,06 \times 10^{-7}$ (9); $2,75 \times 10^{-7}$ (10); $3,43 \times 10^{-7}$ (11); $4,12 \times 10^{-7}$ (12) М. Вставки: зависимости интенсивности флуоресценции родамина 6Ж при 550 нм (**А**) и флуоресцеина при 512 нм (**Б**).

Равновесная константа комплексообразования родамина 6Ж с НЧ золота была рассчитана по методу Скетчарда по результатам тушения флуоресценции красителя [140]. В случае тушения флуоресценции флуоресцеина НЧ золота константа была рассчитана по кривой насыщения при уменьшении сигнала на 50%. Константы для взаимодействия красителей с НЧ золота составили $K_b = 2,8 \pm 0,3 \times 10^8 \text{ М}^{-1}$ и $K_b = 2,1 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$ для родамина 6Ж и флуоресцеина,

соответственно. Энергия Гиббса взаимодействий обоих красителей с НЧ золота дает дополнительные сведения о типе взаимодействия. Так для комплекса родамин 6Ж/НЧ золота она составляет $\Delta G = -48$ кДж/моль, а для комплекса флуоресцеин/НЧ золота $\Delta G = -35$ кДж/моль. Поскольку наночастицы золота имеют сильный отрицательный заряд (~ -12), то можно говорить о наличии электростатической компоненты взаимодействия заряженных красителей с данными НЧ наряду с неэлектростатической. Для связывания родамина 6Ж и НЧ золота энергия Гиббса выражается как $\Delta G = \Delta G_{\text{nel}} + \Delta G_{\text{el}}$; тогда как для связывания флуоресцеина и НЧ золота она представляет собой $\Delta G = \Delta G_{\text{nel}} - \Delta G_{\text{el}}$, где ΔG_{nel} и ΔG_{el} являются энергиями Гиббса для неэлектростатической и электростатической составляющих взаимодействия. Краситель родамин 6Ж имеет один положительный заряд, следовательно, электростатическая компонента энергии Гиббса обеспечивается одним электростатическим контактом, оценочная величина энергии Гиббса которого составляет ~ 5 кДж/моль [141]. Таким образом, можно приблизительно рассчитать значение энергии Гиббса для неэлектростатической составляющей взаимодействия красителей, обладающих подобной структурой, с НЧ золота как $\Delta G_{\text{nel}} = \Delta G - \Delta G_{\text{el}} = -48 - (-5) = -43$ (кДж/моль). При сравнении полученной величины с энергией взаимодействия флуоресцеина и НЧ золота ($\Delta G = -35$ кДж/моль) очевидно, что отрицательные заряды флуоресцеина также вносят вклад в энергию взаимодействия, уменьшая ее на $\Delta \Delta G = 8$ кДж/моль, что приблизительно соответствует наличию двух электростатических отталкиваний в системе дианион флуоресцеина/НЧ золота.

Приведенные выше данные и рассуждения позволяют заключить, что заряд красителя имеет значение при взаимодействии красителя с отрицательно заряженными наночастицами золота. Данный факт наводит на мысль о наличии вклада электростатического взаимодействия при комплексообразовании красителей с исследуемыми золотыми наночастицами.

5.2 Супертушение флуоресценции красителя SYBRGreen I наночастицами золота на матрице ДНК в растворе

При введении в раствор комплекса красителя SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М) с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) НЧ золота ($d \sim 2,5$ нм) наблюдается интенсивное тушение флуоресценции даже при очень низких концентрациях тушителя (НЧ золота) $\leq 1 \times 10^{-7}$ М (рисунок 5.2, А, Б), что свидетельствует о статическом механизме тушения внутри комплекса SG/Au, образованного НЧ золота и молекулой интеркалированного в ДНК красителя [142, 143].

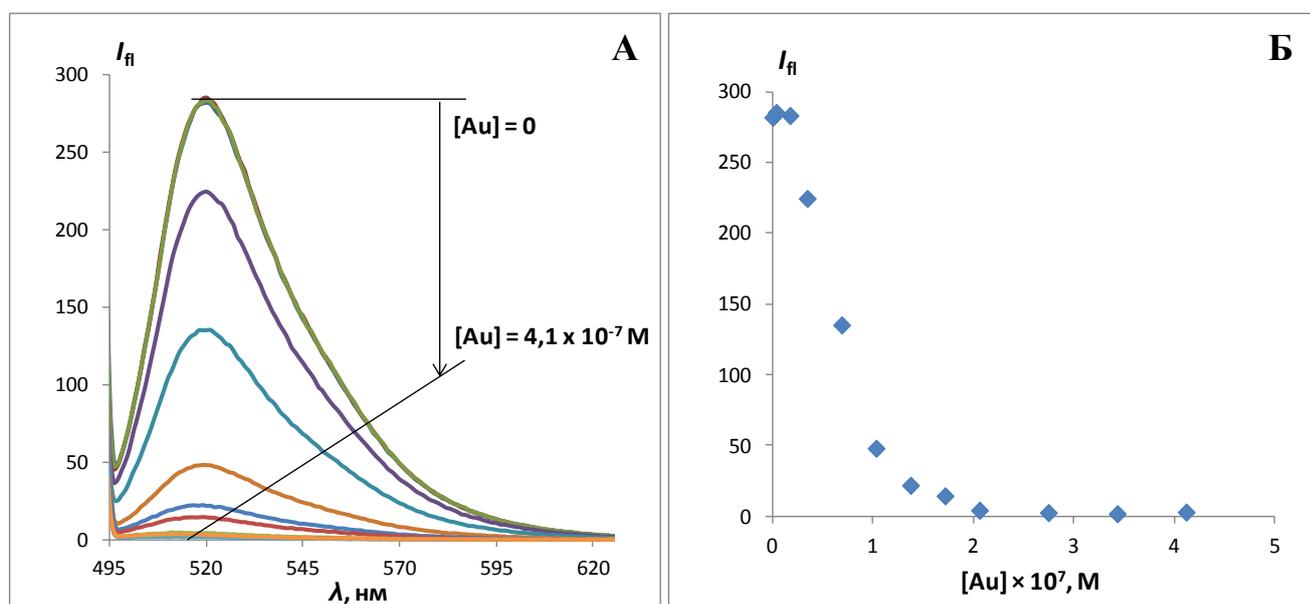


Рисунок 5.2. А – Спектры флуоресценции красителя SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М) в комплексе с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) в присутствии различных концентраций НЧ золота: 0; $3,43 \times 10^{-9}$; $1,72 \times 10^{-8}$; $3,43 \times 10^{-8}$; $6,87 \times 10^{-8}$; $1,03 \times 10^{-7}$; $1,37 \times 10^{-7}$; $1,72 \times 10^{-7}$; $2,06 \times 10^{-7}$; $2,75 \times 10^{-7}$; $3,43 \times 10^{-7}$; $4,12 \times 10^{-7}$ М. Б – Зависимость интенсивности флуоресценции красителя SG от концентрации НЧ золота при 520 нм.

Обнаруженное эффективное тушение флуоресценции красителя SG наночастицами золота на матрице ДНК известно в литературе под названием «супертушение» [105, 106], однако природа данного явления для таких систем ранее не была установлена.

5.2.1 Модели взаимодействия красителя SYBRGreen I с наночастицами золота на матрице ДНК в растворе

Некоторые авторы предприняли попытки описать подобное супертушение флуоресценции хромофоров наночастицами золота (см. 5.2) в рамках модели тушения флуоресценции Штерна-Фольмера [105, 106].

$$I_0/I \approx 1 + K_{LQ}[Q]_0, \quad (5.1)$$

где I и I_0 – интенсивности флуоресценции SG в присутствии различных концентраций тушителя и в отсутствие тушителя, соответственно, K_{LQ} – константа равновесия комплексообразования и $[Q]_0$ – исходная концентрация тушителя. Однако в данной работе использованы сравнимые концентрации люминофора и тушителя, следовательно, использование обычного уравнения Штерна-Фольмера (уравнение 5.1), которое справедливо лишь при $[Q]_0 \gg [L]_0$, исключается. Это подтверждается также нелинейностью зависимости Штерна-Фольмера для исследованного красителя (рисунок 5.3). Константа Штерна-Фольмера, оцененная по начальному линейному участку данной зависимости, составляет $K_{SV} = 1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (рисунок 5.3, вставка).

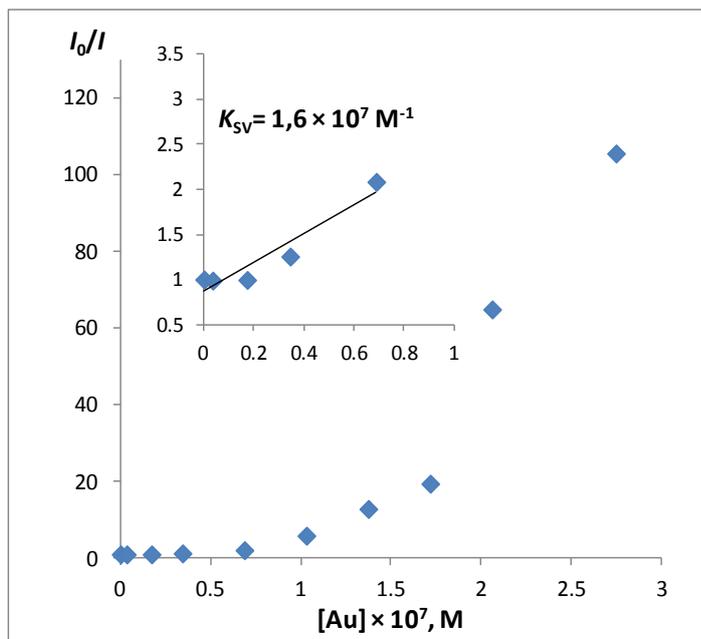


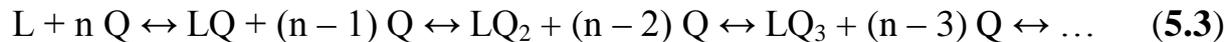
Рисунок 5.3. Зависимость Штерна-Фольмера для тушения флуоресценции SG ($1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$) в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ п. о.) при добавлении различных концентраций НЧ золота. Вставка: начальный участок зависимости Штерна-Фольмера для диапазона концентраций НЧ золота $0 - 6,9 \times 10^{-8} \text{ M}$.

Поскольку в работе использован препарат ДНК, содержащий короткие фрагменты ДНК длиной ~ 600 п. о., то можно считать их достаточно жесткими

молекулами. Кроме того, способность этих молекул ДНК образовывать жидкокристаллические дисперсии также говорит в пользу их жесткой линейной структуры (см. 3.3) [68]. Таким образом, второй моделью, которая была использована для описания взаимодействия SG с НЧ золота в среде относительно жестких коротких молекул дц-ДНК (~ 600 п. о.), была модель Перрена. Для применения данной модели было сделано предположение, что специфическое взаимодействие молекул люминофора и тушителя между собой в основном электронном состоянии отсутствует (**рисунок 5.3**). В данном случае тушение флуоресценции описывается уравнением Перрена, соответствующим статистическому распределению молекул в растворе:

$$I_0/I = \exp(-V_Q[Q]_0) = \exp(-(V_Q[L]_0)([Q]_0/[L]_0)), \quad (5.2)$$

где V_Q – эффективный объем так называемой «сферы тушения» и $[L]_0$ – исходная концентрация SG [143]. Такое же выражение получится, если рассматривать образование бесконечного ряда стехиометрических комплексов (**5.3**)



с одинаковыми значениями констант равновесия на каждой стадии $K = V_Q$.

Аппроксимация данных в полулогарифмических координатах Перрена (**уравнение 5.2**) должна представлять собой прямую линию, выходящую из 1, что не соблюдается, поскольку кривые в данных координатах имеют нелинейный вид (**рисунок 5.4, А, Б**). Кроме того, анализ экспериментов по тушению НЧ золота флуоресценции красителя SG при различных уровнях заполнения ДНК показал, что константа взаимодействия и объем сферы тушения зависят от концентрации SG (**рисунок 5.4, Б**). Уменьшение объема сферы тушения и константы взаимодействия при увеличении концентрации красителя исключает статистическое связывание между SG и НЧ золота и свидетельствует в пользу стехиометрического типа связывания [143].

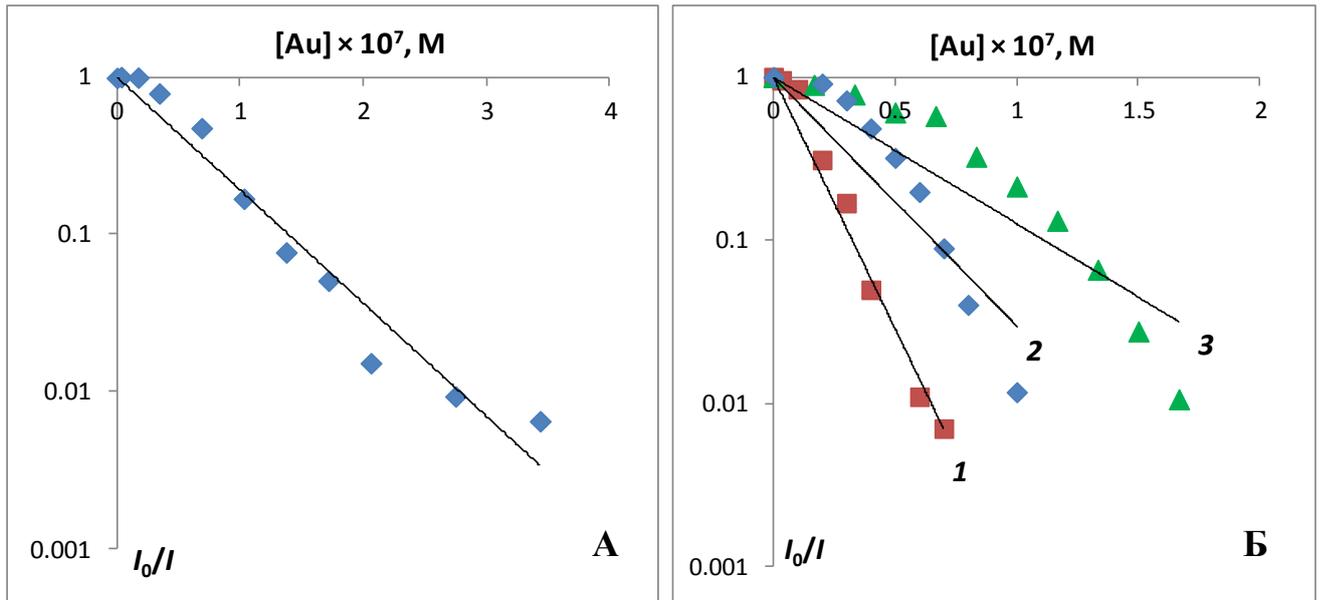


Рисунок 5.4. А – Зависимость Перрена для тушения флуоресценции SG ($8,9 \times 10^{-8}$ М, $\lambda = 520$ нм) в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) при добавлении различных концентраций НЧ золота. Б – Зависимости Перрена для тушения флуоресценции SG: 1 – $3,3 \times 10^{-8}$; 2 – $1,0 \times 10^{-7}$; 3 – $3,0 \times 10^{-7}$ М.

Поскольку модель статистического взаимодействия должным образом не описывает взаимодействие красителя SG с НЧ золота на ДНК, то для описания экспериментальных данных была предложена стехиометрическая модель Скетчарда [140], которую можно представить в виде уравнения:

$$r/C_{\text{free}} = K_a(n - r) \quad (5.4)$$

где $r = C_{\text{bound}}/[Au]$, C_{bound} – концентрация связанного SG, C_{free} – концентрация свободного SG, K_a – равновесная константа комплексообразования и n – стехиометрический коэффициент. Однако при аппроксимации полученных данных для тушения флуоресценции SG при добавлении различных концентраций НЧ золота в координатах Скетчарда (уравнение 5.4) была получена зависимость с максимумом (рисунок 5.5).

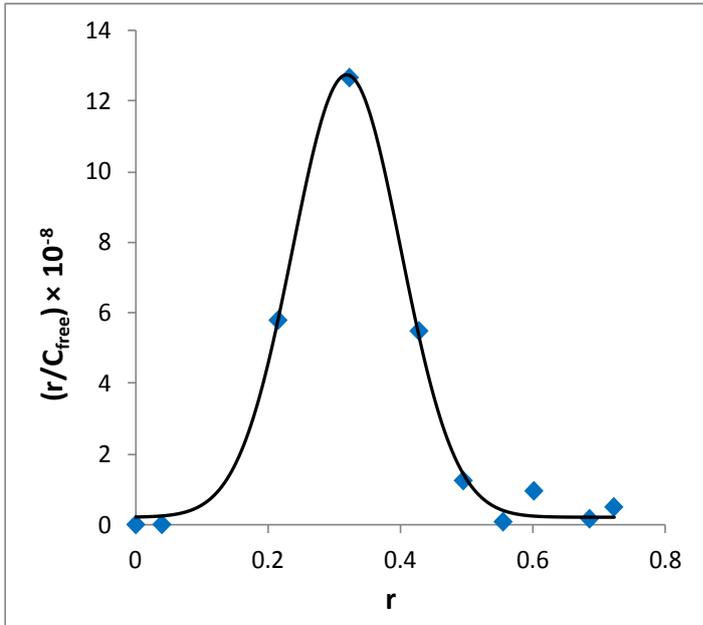


Рисунок 5.5. Отложение Скэтчарда для тушения флуоресценции SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М, $\lambda = 520$ нм) в комплексе с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) при добавлении НЧ золота: 0 ; $3,43 \times 10^{-9}$; $1,72 \times 10^{-8}$; $3,43 \times 10^{-8}$; $6,87 \times 10^{-8}$; $1,03 \times 10^{-7}$; $1,37 \times 10^{-7}$; $1,72 \times 10^{-7}$; $2,06 \times 10^{-7}$; $2,75 \times 10^{-7}$; $3,43 \times 10^{-7}$; $4,12 \times 10^{-7}$ М.

Такая выпуклая форма кривой Скэтчарда предполагает кооперативное взаимодействие SG с НЧ золота на ДНК [144] и может быть адекватно описана уравнением Хилла (5.5):

$$\lg(\theta/(1-\theta)) = n \lg([Au]) + \lg K_b \quad (5.5)$$

где, $\theta = (I_0 - I)/I_0$, K_b – суммарная константа комплексообразования. Для применения данной модели необходимо сделать допущение, согласно которому несколько золотых наночастиц могут связываться с красителем SG. Для определения усредненной константы комплексообразования для каждого комплекса, K_a , взаимодействия всех частиц с красителем считают идентичными, то есть имеющими одинаковое значение константы комплексообразования K_a . Подобное допущение позволяет математически определить K_a из выражения $K_b = (K_a)^n$. Однако такое допущение не имеет физического смысла. Кооперативное взаимодействие характеризуется S-образной кривой насыщения, которая была получена для исследуемой системы SG/НЧ Au в присутствии ДНК в растворе (рисунок 5.6, А).

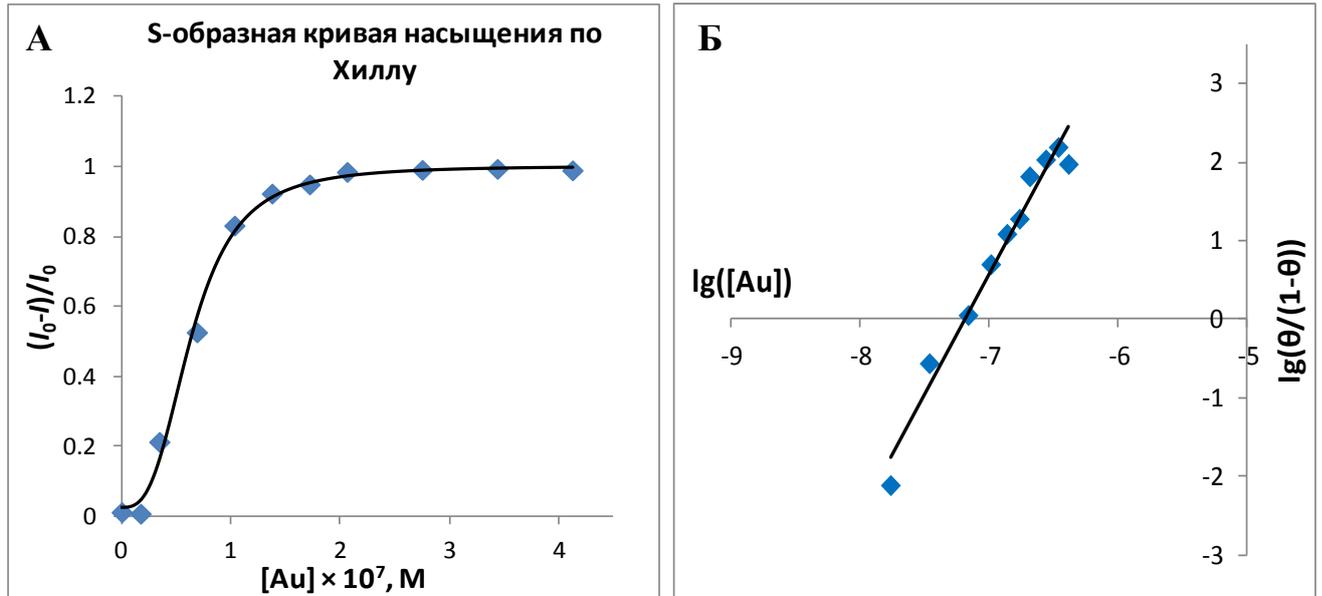


Рисунок 5.6. S-образная кривая насыщения (А) и график Хилла (Б) для тушения флуоресценции SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М, $\lambda = 520$ нм) в комплексе с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) при добавлении различных концентраций НЧ золота.

Положительная кооперативность ($n > 1$) характеризуется тем, что присоединение одной НЧ Au к субстрату (SG) увеличивает сродство к субстрату остальных НЧ. Из графика Хилла получено значение суммарной константы комплексообразования НЧ золота с SG $K_b = 7,9 \pm 0,8 \times 10^{21}$ М⁻¹, а также значение $K_a = 2,0 \pm 0,1 \times 10^7$ М⁻¹ на матрице ДНК (**рисунок 5.6, Б**). Такое высокое значение константы комплексообразования свидетельствует о формировании высокоспецифичного прочного комплекса между НЧ золота и интеркалированными флуорофорами, что и обуславливает эффективное тушение флуоресценции в системе. Полученный коэффициент Хилла $n \sim 3$ свидетельствует о том, что при исследуемом взаимодействии образуются кластеры из трех НЧ золота вблизи одного красителя. Образование кластеров из нескольких НЧ золота в ДНК в присутствии и в отсутствие красителя SG также было подтверждено методом спектрофотометрии (см. 5.2.4).

Еще одним новым подходом для описания эффекта «супертушения» флуоресценции красителя SG, наряду с моделью кооперативного связывания, является рассмотрение раствора ДНК как двухфазной системы, которая содержит объемную фазу (буферный раствор) и микрофазу (молекулы ДНК). Локальные концентрации реагентов внутри микрофазы могут быть на несколько

порядков больше, чем их действительные концентрации в общем растворе, что также может обуславливать более яркие оптические эффекты в подобных системах [143].

С учетом эффекта концентрирования реагентов в микрофазе концентрацию НЧ золота и красителя SG в микрофазе молекул ДНК можно определить как $[Q]_m = [Q]/\nu$ и $[L]_m = [L]/\nu$, где $[Q]$, $[L]$ и $[Q]_m$, $[L]_m$ – концентрации тушителя и лиганда в растворе и в микрофазе ДНК, соответственно, а ν – объемная доля микрофазы в растворе, рассчитанная исходя из объема одной молекулы ДНК и количества молекул в растворе на основании концентрации ДНК в M пар оснований ($\nu = 1 \times 10^{-5}$). Применение модели Хилла с учетом микрофазного подхода дает значение суммарной константы комплексообразования НЧ золота с SG на ДНК $K_b = 4,6 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, а также значение $K_a = 1,66 \pm 0,06 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, которое почти на пять порядков меньше значения $K_a = 2,0 \pm 0,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, полученного для той же системы, рассматриваемой как гомогенный раствор ДНК. Таким образом, можно заключить, что эффективное тушение флуоресценции обусловлено эффектом концентрирования флуорофора и тушителя с довольно низкой константой комплексообразования и специфичностью взаимодействия между ними. Данный подход подразумевает, что все НЧ золота находятся в микрофазе, что, вероятно, свидетельствует о высокой аффинности НЧ золота к ДНК, а не к флуорофорам SG, интеркалированным в ДНК.

Итак, показано, что модель кооперативного связывания Хилла хорошо описывает взаимодействие НЧ золота с красителем, интеркалированным в ДНК, и подразумевает образование агрегатов наночастиц золота, состоящих из трех частиц вблизи каждого красителя на матрице ДНК. Высокое значение константы комплексообразования свидетельствует о формировании высокоспецифичного прочного комплекса SG/ДНК/Au_n, что и обуславливает эффективное тушение флуоресценции в системе. Однако применение микрофазного подхода позволяет предположить, что ключевую роль в исследуемых тройных системах играет высокая аффинность НЧ золота к ДНК, которая приводит к концентрированию

наночастиц в микрофазе ДНК и образованию неспецифических комплексов с красителями в среде биомакромолекулы. Таким образом, образование агрегатов из трех наночастиц опосредовано в случае гомогенной модели высокой специфичностью взаимодействия НЧ золота с красителем в комплексе с ДНК, тогда как в случае микрофазного подхода высоким сродством НЧ золота к ДНК и концентрированием наночастиц в микрофазе нуклеиновой кислоты [143].

5.2.2 Механизмы тушения флуоресценции красителя SYBRGreen I наночастицами золота на матрице ДНК

Тушение флуоресценции SG в комплексе с двухцепочечной ДНК при введении НЧ может быть обусловлено несколькими процессами. Статическое тушение может происходить при образовании нефлуоресцирующего комплекса SG/НЧ Au на матрице ДНК (тип 1). Также возможно осуществление резонансного переноса энергии от красителя SG на НЧ золота, не находящуюся в непосредственном контакте с молекулой красителя, а залегающую, например, в малой бороздке ДНК (тип 2), поскольку выполняется условие спектрального перекрытия флуоресценции донора (SG) и поглощения акцептора (НЧ Au). Для подтверждения наличия в системе того или иного процесса были измерены времена жизни флуоресценции комплекса SG/ДНК в присутствии различных концентраций НЧ золота (таблица 5.1) [142, 143].

Таблица 5.1. Времена жизни флуоресценции SG в комплексе с дц-ДНК в растворе в присутствии различных концентраций НЧ золота, $[SG] = 1 \times 10^{-7}$ М, $[ДНК] = 1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.

[Au], М	$\tau_{\text{фл}}$, нс
0	4,9
$1,3 \times 10^{-8}$	4,8
$2,4 \times 10^{-8}$	4,7
$4,4 \times 10^{-8}$	4,9

Ошибка измерения не превышала 5%.

свидетельствует о преимущественно статическом механизме тушения флуоресценции. Постоянство времен жизни флуоресценции также позволяет

Обнаружено, что время жизни флуоресценции красителя, интеркалированного в ДНК, ($\sim 4,8 \pm 0,2$ нс) в присутствии чрезвычайно малых концентраций ($(1-4) \times 10^{-8}$ М) золотых НЧ не изменяется (таблица 5.1), что

усомниться в возможности осуществления процесса резонансного переноса энергии от возбужденного состояния красителя на НЧ золота в данной системе. Расстояние между донором и акцептором энергии в комплексах 2 типа значительно больше, чем требуется для реализации процесса переноса энергии. Данный факт также подтверждается постоянством анизотропии флуоресценции при различных концентрациях НЧ золота в исследуемой системе SG/ДНК (рисунок 5.7). Флуоресцируют интеркалированные в ДНК молекулы красителя, которые не образуют комплекс с золотыми наночастицами, и находятся на значительном расстоянии от НЧ [104].

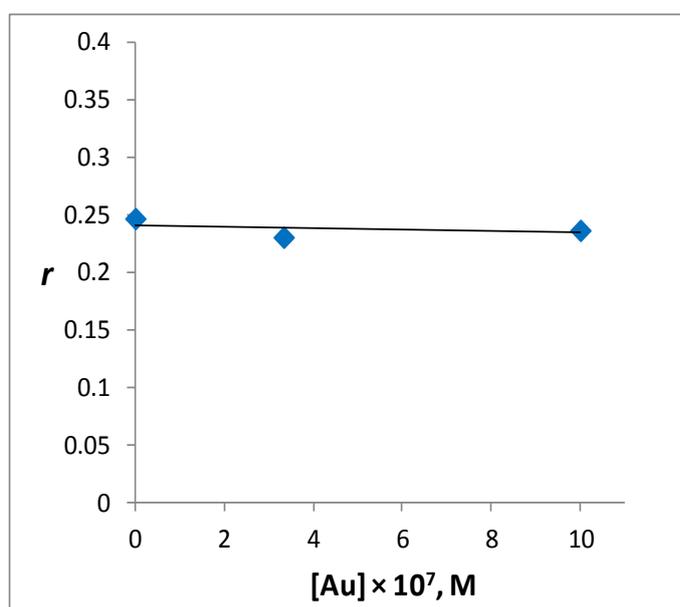


Рисунок 5.7. Зависимость анизотропии флуоресценции красителя SG в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о) от добавляемой концентрации НЧ золота.

Еще одним возможным процессом, обуславливающим уменьшение интенсивности флуоресценции интеркалированного в ДНК красителя в присутствии НЧ золота, является ускорение интеркомбинационной конверсии под действием внешнего тяжелого атома (атомы золота в НЧ). В присутствии тяжелого атома усиливается спин-орбитальное взаимодействие, в результате чего снимается запрет по мультиплетности для перехода в триплетное состояние, и происходит ускорение интеркомбинационной конверсии.

На основании анализа литературы и свойств наночастиц золота была предположена возможность осуществления переноса электрона с красителя на НЧ золота [113]. Были сделаны попытки зафиксировать перенос электрона с SG

на НЧ золота на матрице ДНК, который, по-видимому, может происходить, в силу более высокой электроотрицательности наночастиц металлов по сравнению с массивными образцами того же металла, и тем более высокой электроотрицательности маленьких ($d \sim 2,5$ нм) частиц, которые использованы в данном исследовании, по сравнению с частицами больших размеров [145]. Однако зафиксировать перенос электрона при помощи микросекундного импульсного фотолиза и наносекундного лазерного фотолиза не удалось, что может говорить в пользу сверхбыстрого обратимого переноса электрона в фемтосекундной шкале времен. Экспериментальное доказательство этой гипотезы требует дополнительных исследований.

Суммируя приведенные выше экспериментальные и литературные данные, в качестве основного механизма уменьшения флуоресценции красителя SG, интеркалированного в ДНК, в присутствии НЧ золота предложено статическое тушение с образованием нефлуоресцирующего комплекса. Не исключен также вклад в тушение флуоресценции красителя таких процессов, как сверхбыстрый перенос электрона в системе SG/Au и ускорение интеркомбинационной конверсии под действием тяжелого атома.

5.2.3 Анализ кинетических кривых уменьшения флуоресценции красителя SYBRGreen I в комплексе с ДНК в растворе под действием наночастиц золота

На рисунке 5.8 (А) представлены кривые уменьшения флуоресценции красителя SG в комплексе с ДНК при добавлении увеличивающихся концентраций НЧ золота. Установлена зависимость наблюдаемой константы скорости взаимодействия НЧ золота с красителем ($1/\tau$) от добавляемой концентрации НЧ золота. Данная зависимость позволяет определить кинетическую константу бимолекулярной реакции взаимодействия SG с наночастицами золота на матрице ДНК, $k_1 = 1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (рисунок 5.8, Б) [142]. На основании той же зависимости можно заключить, что в данном равновесии константа скорости обратной реакции (k_{-1}) много меньше константы

скорости прямой реакции k_1 , и, следовательно, образуется очень прочный комплекс SG/НЧ Au на матрице дц-ДНК.

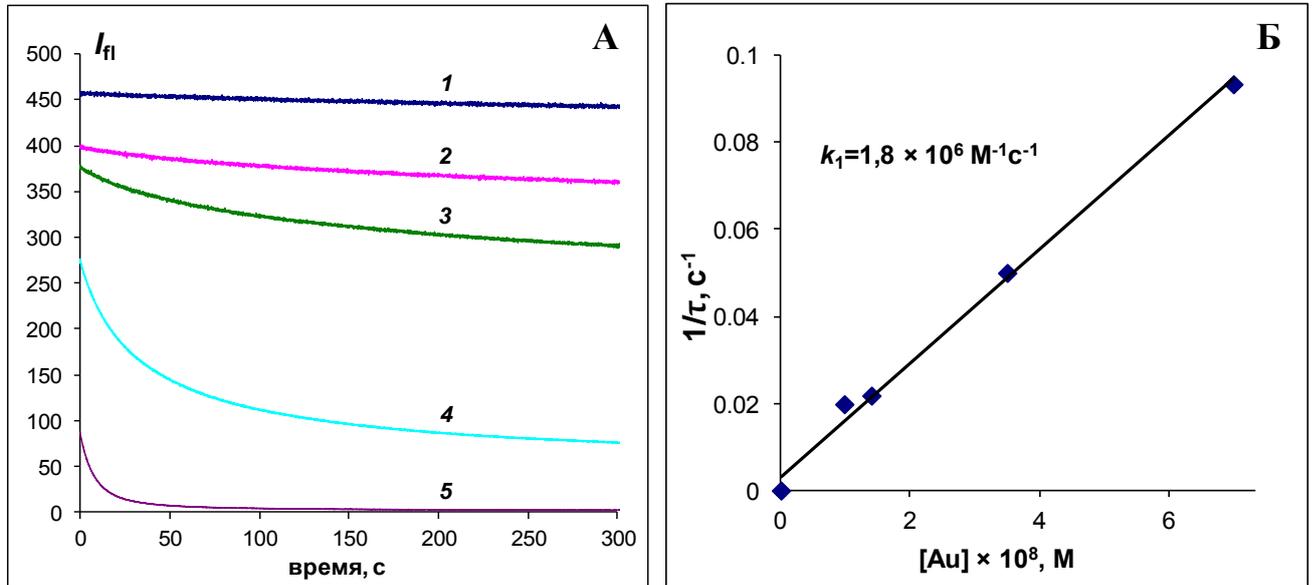


Рисунок 5.8. А – Кинетические кривые уменьшения флуоресценции красителя SG ($1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$) в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) при добавлении различных концентраций НЧ золота: 0 (1); $8,8 \times 10^{-9}$ (2); $1,76 \times 10^{-8}$ (3); $3,5 \times 10^{-8}$ (4); 7×10^{-8} (5) М. Б – Зависимость наблюдаемой константы скорости взаимодействия НЧ золота с SG в комплексе с дц-ДНК, рассчитанной по моноэкспоненциальной модели, от добавляемой концентрации НЧ золота, $k_1 = 1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$.

Полученное значение константы меньше значения диффузионной константы ($\sim 4,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ [146]), что говорит о диффузионном контроле данной реакции со стерическим фактором $f = k_1/k_{\text{diff}} = 4,4 \times 10^{-4}$, обусловленным наличием биополимера ДНК в растворе. Кроме того, диффузионно-контролируемый режим данной реакции был подтвержден зависимостью константы бимолекулярного взаимодействия SG/НЧ Au от концентрации дц-ДНК в растворе, т. е. от вязкости раствора (рисунок 5.9, А, Б).

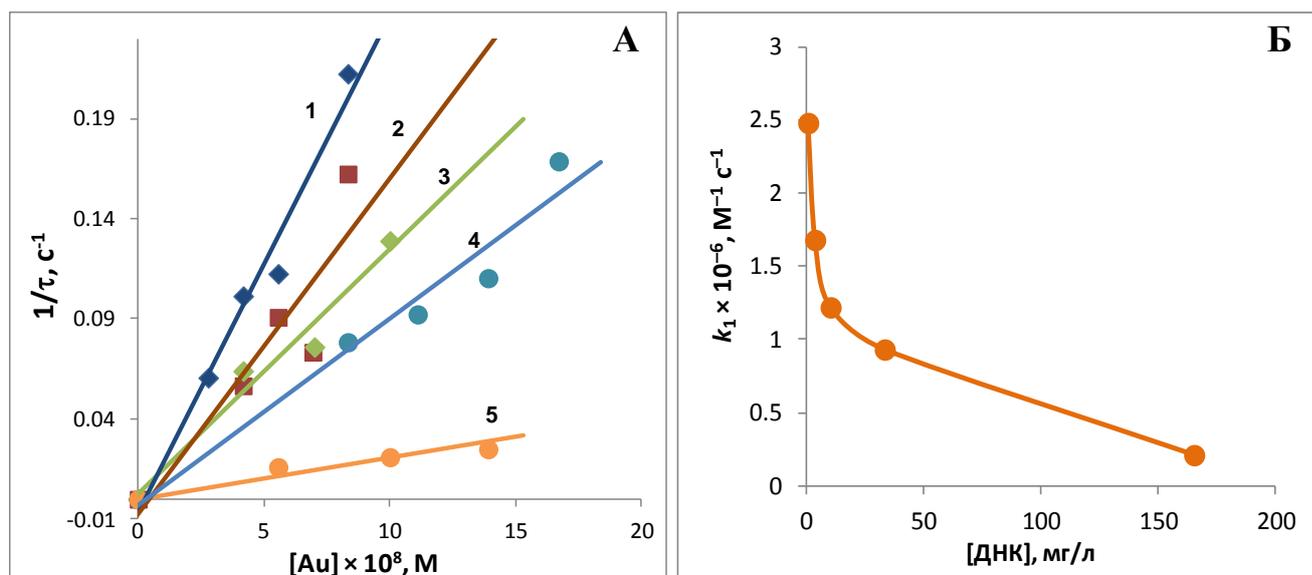


Рисунок 5.9. А – Зависимости наблюдаемой константы скорости взаимодействия НЧ золота с SG в комплексе с дц-ДНК (5×10^{-7} (1); 5×10^{-6} (2); $1,5 \times 10^{-5}$ (3); 5×10^{-5} (4); $2,5 \times 10^{-4}$ (5) М п. о.), рассчитанной по моноэкспоненциальной модели, от добавляемой концентрации НЧ золота. Б – Зависимость константы тушения k_1 красителя SG ($1,1 \times 10^{-7}$ М) различными количествами наночастиц золота от концентрации ДНК.

Таким образом, доказано, что взаимодействие между SG и НЧ золота на матрице ДНК ограничивается вязкостью среды, опосредованной наличием ДНК в растворе, и, следовательно, является диффузионно контролируемым процессом.

5.2.4 Образование ассоциатов наночастиц золота в присутствии комплекса красителя SYBRGreen I с ДНК

На **рисунке 5.10** представлены спектры поглощения НЧ золота в воде (кривая 1), в присутствии дц-ДНК (кривая 2) и в присутствии комплекса SG/дц-ДНК (кривая 3). При добавлении НЧ золота к дц-ДНК происходит образование кластеров из нескольких НЧ золота, что сопровождается появлением слабо выраженного максимума плазмонной полосы при 507 нм в спектре поглощения НЧ золота. Полоса плазмонного резонанса становится более ярко выраженной в присутствии комплексов SG с дц-ДНК и смещается в длинноволновую область ($\lambda = 531$ нм) по сравнению с соответствующим спектром в отсутствие красителя SG, что соответствует увеличению размера образующегося кластера.

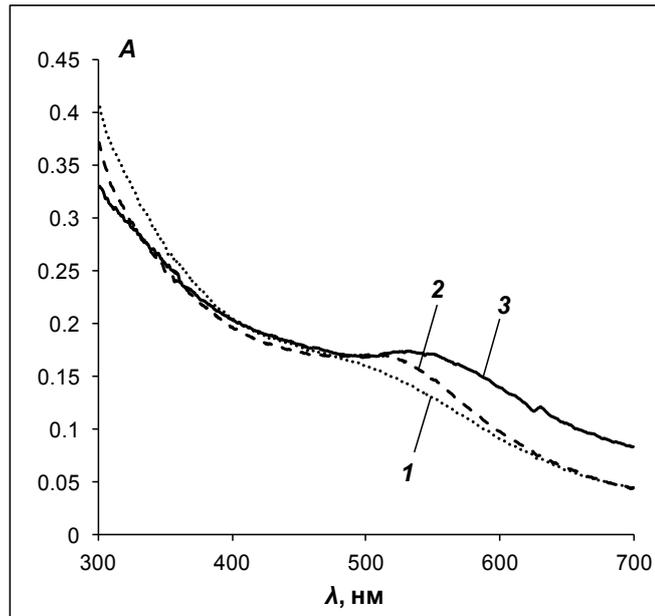


Рисунок 5.10. Спектры поглощения НЧ золота ($1,8 \times 10^{-7}$ М) в воде – **1**, в присутствии дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М) – **2** и в присутствии комплексов SG (1×10^{-7} М) с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М) – **3**.

Образование ассоциатов из нескольких НЧ золота в присутствии комплексов SG/дц-ДНК доказано появлением полосы плазмонного резонанса в спектрах поглощения, что свидетельствует о специфическом взаимодействии НЧ золота с молекулами красителя в комплексе с ДНК, и согласуется с результатами, полученными при помощи модели Хилла, предложенной для описания взаимодействия SG с НЧ золота в дц-ДНК в параграфе 5.2.1.

Заключение

Исследованы взаимодействия в тройных системах, включающих ультрамалые НЧ золота диаметром 2,5 нм и комплексы красителя SYBRGreen с двухцепочечной ДНК в растворе, спектрофлуориметрическим методом. Обнаружен эффект «супертушения» флуоресценции комплексов SG/дц-ДНК при введении НЧ Au.

Было рассмотрено несколько моделей, в том числе статистических и стехиометрических, для описания взаимодействия SG с НЧ золота в среде биомакромолекулы. Было установлено, что тушение флуоресценции красителя SG в комплексе с дц-ДНК в присутствии НЧ Au происходит по механизму статического тушения за счет кооперативного связывания и образования

нефлуоресцирующего комплекса SG/Au_n, а также вероятен сверхбыстрый перенос электрона между красителем и электроотрицательными НЧ Au. Полученный коэффициент кооперативности ($n \sim 3$) соответствует образованию кластера из трех НЧ золота.

Природа образования ассоциата из трех наночастиц золота может быть объяснена высокой специфичностью наночастиц золота к красителю SG, интеркалированному в ДНК, на основании полученной высокой константы комплексообразования $K_a = 2,0 \pm 0,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ при рассмотрении системы как гомогенного раствора ДНК. Применение микрофазного подхода, напротив, приводит к выводу о низкой специфичности взаимодействия красителя и НЧ золота ($K_a = 1,66 \pm 0,06 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), и образование агрегатов из нескольких наночастиц вблизи красителя в данном случае может быть обусловлено высоким сродством НЧ золота к ДНК, которое приводит к увеличению локальной концентрации наночастиц в микрофазе.

Образование агрегата из нескольких НЧ золота в присутствии комплексов SG/ДНК было также подтверждено изменением полосы плазмонного поглощения. Данные результаты также говорят в пользу специфического взаимодействия НЧ золота с красителем, интеркалированным в ДНК, а не с любыми участками ДНК статистическим образом, таким образом, делая более правомерным гомогенный подход при рассмотрении исследуемой тройной системы.

Отсутствие процесса переноса энергии между SG и НЧ золота на матрице дц-ДНК в растворе было подтверждено результатами измерения анизотропии флуоресценции SG в присутствии различных количеств НЧ золота.

Установлена зависимость комплексообразования между красителем SG и наночастицами золота в среде ДНК от концентрации биомакромолекул, т. е. от вязкости системы, что говорит о диффузионно контролируемом характере данного взаимодействия.

Выводы

1. Константа комплексообразования тетрафенилпорфиринов с ДНК уменьшается вследствие стерических препятствий, обусловленных увеличением размера заместителей и введением атома металла в координационную сферу макроцикла.
2. Катионные ТФП способны образовывать два типа комплексов с ДНК: интеркаляционный и внешний, в малой бороздке ДНК. Увеличение объёма заместителей и введение металла в макроцикл приводит к преимущественному формированию внешнего комплекса залегания.
3. Карбоцианиновый краситель SG образует два типа комплексов с ДНК: интеркаляционный при низких концентрациях красителя и внешний комплекс при высоких уровнях заполнения ДНК с образованием ассоциата в малой бороздке.
4. Эффект самотушения красителя SG обнаружен в упорядоченных структурах дисперсий на основе ДНК. Эффективность данного процесса возрастает с увеличением компактизации молекул ДНК. Этот эффект обусловлен переносом энергии по Фёрстеру (hetero-FRET) с возбужденного состояния интеркалированного в ДНК мономера SG на нефлуоресцирующий ассоциат красителя в малой бороздке ДНК.
5. Обнаружен эффект «супертушения» флуоресценции в системах SG/дц-ДНК при введении наночастиц золота, удовлетворительно описываемый моделью кооперативного связывания по Хиллу, которая подразумевает статический тип тушения за счет образования нефлуоресцирующего комплекса ДНК/SG/Au₃.
6. Образование агрегатов из трёх наночастиц золота в исследуемых тройных системах, включающих комплексы SG/ДНК и наночастицы золота, объясняется в рамках гомогенной модели специфическим прочным связыванием наночастиц с красителем SG, интеркалированным в ДНК, или в рамках микрофазной модели эффектом неспецифического концентрирования наночастиц.
7. Доказан диффузионный характер взаимодействия наночастиц золота с красителем SG в комплексах с ДНК.

Список литературы

1. Колесникова, Д. В. ДНК-специфичные низкомолекулярные соединения: учебное пособие / Д. В. Колесникова, А. Л. Жузе, А. С. Заседателев – Москва: МФТИ, 1998. – 123 с.
2. Waring, M. J. DNA modification and cancer / M. J. Waring // *Annu. Rev. Biochem.* – 1981. – V. 50. – P. 159–192.
3. Li, H. J. Relaxation studies of the proflavine-DNA complex: the kinetics of an intercalation reaction / H. J. Li, D. M. Crothers // *J. Mol. Biol.* – 1969. – V. 39. – Issue 3. – P. 461–477.
4. Muller, W. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands / W. Muller, D. M. Crothers // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – V. 54. – Issue 1. – P. 267–277.
5. Muller, W. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A - T-specific non-intercalating DNA ligands / W. Muller, F. Gautier // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – V. 54. – Issue 2. – P. 385–394.
6. Bigey, P. DNA cleavage by a ‘metalloporphyrin-spermine-oligonucleotide’ molecule / P. Bigey, G. Pratviel, B. Meunier // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1995. – Issue 2. – P. 181–182.
7. Zimmer, C. Effects of the antibiotics netropsin and distamycin A on the structure and function of nucleic acids / C. Zimmer // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1975. – V. 15. – Issue 0. – P. 285–318.
8. Zimmer, C. Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material / C. Zimmer, U. Wahnert // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1986. – V. 47. – Issue 1. – P. 31–112.
9. Zasedatelev, A. S. Binding of netropsin to DNA and synthetic polynucleotides. / A. S. Zasedatelev, G. V. Gursky, C. Zimmer, H. Thrum // *Mol. Biol. Rep.* – 1974. – V. 1. – Issue 6. – P. 337–342.

10. Chen, X. Binding of two distamycin A molecules in the minor groove of an alternating B-DNA duplex / X. Chen, B. Ramakrishnan, S. T. Rao, M. Sundaralingam, // *Nat. Struct. Biol.* –1994. – V. 1. – Issue 3. – P. 169–175.
11. Tuite, E. Methylene Blue Intercalates with Triple Helical Poly(dT).Poly(dA).Poly(dT) but not Duplex Poly(dA).Poly(dT) / E. Tuite, B. Norden // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1995. – P. 53–54.
12. Kim, S. K. Methyl green. A DNA major-groove binding drug / S. K. Kim, B. Norden // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 315. – Issue 1. – P. 61–64.
13. Warpehoski, M. A. Sequence selectivity of DNA covalent modification / M. A. Warpehoski, L. H. Hurley // *Chem. Res. Toxicol.* – 1988. – V. 1. – Issue 6. – P. 315–333.
14. Lambrechts, S. A. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin / S. A. Lambrechts, M. C. Aalders, J. Van Marle // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – V. 49. – Issue 5. – P. 2026–2034.
15. Engelmann, F. M. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins / F. M. Engelmann, S. V. Rocha, H. E. Toma, K. Araki, M. S. Baptista // *Int. J. Pharm.* – 2007. – V. 329. – Issue (1–2). – P. 12–18.
16. Efimov, A. V., et al., Irregular behavior of 5,10,15,20-tetrakis pentafluorophenyl porphyrin in Langmuir–Blodgett films. A. V. Efimov, M. Anikin, N. V. Tkachenko, A. F. Mironov, H. Lemmetyinen // *Chemical Physics Letters.* – 1998. – V. 289. – P. 572–578.
17. Новиков, Н. В. Синтез и свойства катионных производных мезо-тетра-(4-пиридил)порфирина / Н. В. Новиков, В. В. Старков, К. А. Формировский, Н. А. Брагина, И. П. Ушакова, А. Ф. Миронов // *Вестник МИТХТ.* – 2009. – Т. 4. – Вып. 4. – С. 26–30.
18. Zanelli, G.D. Synthetic porphyrins as tumour-localizing agents / G. D. Zanelli, Kaelin A. C. // *Br. J. Radiol.* – 1981. – V. 54. – Issue 641. – P. 403–407.
19. Patronas, N. J. Metalloporphyrin contrast agents for magnetic resonance imaging of human tumors in mice. / N. J. Patronas, J. S. Cohen, R. H. Knop, A. J. Dwyer, D.

- Colcher, J. Lundy, F. Mornex, P. Hambright, M. Sohn, C. E. Myers // *Cancer Treat. Rep.* – 1986. – V. 70. – Issue 3. – P. 391–395.
20. Ben-Hur, E. Advances in photochemical approaches for blood sterilization / E. Ben-Hur, B. Horowitz // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – V. 62. – Issue 3. – P. 383–388.
21. Pasternack, R. F. Porphyrin Assemblies on DNA as Studied by a Resonance Light-Scattering Technique / R. F. Pasternack, C. Bustamante, P. J. Collings, A. Giannetto, E. J. Gibbs // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – V. 115. – P. 5393–5399.
22. Ethirajan, M. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy / M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R. K. Pandey // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – V. 40. – Issue 1. – P. 340–362.
23. Rosenkranz, A. A., et al., Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting drugs enhance photosensitizer activity / A. A. Rosenkranz, V. G. Lunin, P. V. Gulak, O. V. Sergienko, M. A. Shumiantseva, O. L. Voronina, D. G. Gilyazova, A. P. John, A. A. Kofner, A. F. Mironov, D. A. Jans, A. S. Sobolev // *FASEB J.* – 2003. – V. 17. – Issue 9. – P. 1121–1123.
24. Mettath, S. DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position / S. Mettath, B. R. Munson, R. K. Pandey // *Bioconjug. Chem.* – 1999. – V. 10. – Issue 1. – P. 94–102.
25. Wall, R. K. H(2)D3: a cationic porphyrin designed to intercalate into B-form DNA (H(2)D3 = trans-di(N-methylpyridium-3-yl)porphyrin) / R. K. Wall, A. H. Shelton, L. C. Bonaccorsi, S. A. Bejune, D. Dube, D. R. McMillin // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – Issue 46. – P. 11480–11481.
26. Pasternack, R. F. Interactions of porphyrins with nucleic acids / R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, J. J. Villafranca // *Biochemistry.* – 1983. – V. 22. – Issue 10. – P. 2406–2414.
27. Chen, B., et al., Synthesis of some multi- β -substituted cationic porphyrins and studies on their interaction with DNA / B. Chen, S. Wu, X. Zhou, X. Cao // *Tetrahedron.* – 2006. – V. 62. – Issue 23. – P. 5487–5497.

28. Pasternack, R. F. Interactions of Porphyrins and Metalloporphyrins with Single-Stranded Poly(dA) / R. F. Pasternack, R. A. Brigandi, M. J. Abrams, A. P. Williams, E. J. Gibbs // *Inorg. Chem.* – 1990. – V. 29. – P. 4483–4486.
29. Yamakawa, N. Solution properties and photonuclease activity of cationic bis-porphyrins linked with a series of aliphatic diamines / N. Yamakawa, Y. Ishikawa, T. Uno // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. – 2001. – V. 49. – Issue 12. – P. 1531–1540.
30. Kim, J. O. Binding mode of cationic monomer and dimer porphyrin with native and synthetic polynucleotides studied by polarized light spectroscopy / J. O. Kim, Y. A. Lee, B. Jin, T. Park, R. Song, S. K. Kim // *Biophys. Chem.* – 2004. – V. 111. – Issue 1. – P. 63–71.
31. Lee, Y. A. Binding of meso-tetrakis(N-methylpyridium-4-yl)porphyrin to triplex oligonucleotides: evidence for the porphyrin stacking in the major groove / Y. A. Lee, J. O. Kim, T. S. Cho, R. Song, S. K. Kim // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – Issue 27. – P. 8106–8107.
32. Ernst, L. A. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups / L. A. Ernst, R. K. Gupta, R. B. Mujumdar, A. S. Waggoner // *Cytometry*. – 1989. – V. 10. – Issue 1. – P. 3–10.
33. Southwick, P. L. Cyanine dye labeling reagents – carboxymethylindocyanine succinimidyl esters / P. L. Southwick, L. A. Ernst, E. W. Tauriello, S. R. Parker, R. B. Mujumdar, S. R. Mujumdar, H. A. Clever, A. S. Waggoner // *Cytometry*. – 1990. – V. 11. – Issue 3. – P. 418–430.
34. Mujumdar, R. B., et al., Cyanine dye labeling reagents containing isothiocyanate groups / R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, A. S. Waggoner // *Cytometry*. – 1989. – V. 10. – Issue 1. – P. 11–19.
35. West, W. Spectral sensitivity and the mechanism of spectral sensitization / W. West, P. B. Gilman. – In the book *The Theory of Photographic Process*. – 4th ed.; series ed. T. H. James. – New York: Macmillan. Pub. Co, 1977. – 715 p.
36. Rye, H. S. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications / H. S. Rye, S. Yue,

- D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies, A. N. Glazer // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20. – Issue 11. – P. 2803–2812.
37. Goodwin, P. M. Rapid sizing of individual fluorescently stained DNA fragments by flow cytometry / P. M. Goodwin, M. E. Johnson, J. C. Martin, W. P. Ambrose, B. L. Marrone, J. H. Jett, R. A. Keller // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – V. 21. – Issue 4. – P. 803–806.
38. Castro, A. Fluorescence Detection and Size Measurement of Single DNA-Molecules / A. Castro, F. R. Fairfield, E. B. Shera // *Anal. Chem.* – 1993. – V. 65. – Issue 7. – P. 849–852.
39. Schwartz, D. C. Ordered Restriction Maps of *Saccharomyces-Cerevisiae* Chromosomes Constructed by Optical Mapping / D. C. Schwartz, X. J. Li, L. I. Hernandez, S. P. Ramnarain, E. J. Huff, Y. K. Wang // *Science.* – 1993. – V. 262. – Issue 5130. – P. 110–114.
40. Cai, W. Ordered restriction endonuclease maps of yeast artificial chromosomes created by optical mapping on surfaces / W. Cai, H. Aburatani, V. P. Stanton Jr., D. E. Housman, Y. K. Wang, D. C. Schwartz // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – Issue 11. – P. 5164–5168.
41. Gurrieri, S. Direct visualization of individual DNA molecules by fluorescence microscopy: Characterization of the factors affecting signal/background and optimization of imaging conditions using YOYO / S. Gurrieri, K. S. Wells, I. D. Johnson, C. Bustamante // *Anal. Biochem.* – 1997. – V. 249. – Issue 1. – P. 44–53.
42. Clegg, R. M. Fluorescence resonance energy transfer analysis of the structure of the four-way DNA junction / R. M. Clegg, A. I. Murchie, A. Zechel, C. Carlberg, S. Diekmann, D. M. Lilley // *Biochemistry.* – 1992. – V. 31. – Issue 20. – P. 4846–4856.
43. Norman, D. G. Location of cyanine-3 on double-stranded DNA: importance for fluorescence resonance energy transfer studies / D. G. Norman, R. J. Grainger, D. Uhrin, D. M. Lilley // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – Issue 21. – P. 6317–6324.
44. Zhu, H. High-sensitivity capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using monomeric and dimeric fluorescent intercalating dyes / H. Zhu, S. M.

- Clark, S. C. Benson, H. S. Rye, A. N. Glazer, R. A. Mathies // *Anal. Chem.* – 1994. – V. 66. – Issue 13. – P. 1941–1948.
45. Schwartz, H. E. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection of PCR fragments using thiazole orange / H. E. Schwartz, K. J. Ulfelder // *Anal. Chem.* – 1992. – V. 64. – Issue 15. – P. 1737–1740.
46. Bengtsson, M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR / M. Bengtsson, H. J. Karlsson, G. Westman, M. Kubista // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – Issue 8. – P. 1–5(e45).
47. Hirons, G. T. TOTO and YOYO: new very bright fluorochromes for DNA content analyses by flow cytometry / G. T. Hirons, J. J. Fawcett, H. A. Crissman // *Cytometry.* – 1994. – V. 15. – Issue 2. – P. 129–140.
48. Armitage, B. Vectorial photoinduced electron transfer between phospholipid membrane-bound donors and acceptors / B. Armitage, D. F. O'Brien // *J. Am. Chem. Soc.* – 1992. – V. 114. – Issue 19. – P. 7396–7403.
49. Reers, M. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential / M. Reers, T. W. Smith, L. B. Chen // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30. – Issue 18. – P. 4480–4486.
50. Petty, J. T. Thermodynamic Characterization of the Association of Cyanine Dyes with DNA / J. T. Petty, J. A. Bordelon, M. E. Robertson // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104. – Issue 30. – P. 7221–7227.
51. Srinivasan, K. Enhanced detection of PCR products through use of TOTO and YOYO intercalating dyes with laser induced fluorescence – capillary electrophoresis / K. Srinivasan, S. C. Morris, J. E. Girard, M. C. Kline, D. J. Reeder // *Appl. Theor. Electrophor.* – 1993. – V. 3. – Issue 5. – P. 235–239.
52. Figeys, D. Use of the fluorescent intercalating dyes POPO-3, YOYO-3 and YOYO-1 for ultrasensitive detection of double-stranded DNA separated by capillary electrophoresis with hydroxypropylmethyl cellulose and non-cross-linked polyacrylamide / D. Figeys, E. Arriaga, A. Renborg, N. J. Dovichi // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – V. 669. – Issue 1-2. – P. 205–216.

53. Netzel, T. L. Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromomphoric DNA Stains / T. L. Netzel, K. Nafisi, M. Zhao, J. R. Lenhard, I. Johnson // *J. Phys. Chem.* – 1995. – V. 99. – Issue 51. – P. 17936–17947.
54. Zhang, X.-H. Microwave-assisted solvent-free synthesis and spectral properties of some dimethine cyanine dyes as fluorescent dyes for DNA detection / X.-H. Zhang, L.-Y. Wang, Z.-X. Nan, S.-H. Tan, Z.-X. Zhang // *Dyes and Pigments.* – 2008. – V. 79. – Issue 2. – P. 205–209.
55. Timcheva, I. I. Fluorescence spectral characteristics of novel asymmetric monomethine cyanine dyes in nucleic acid solutions / I. I. Timcheva, V. A. Maximova, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, R. W. Sabnis, I. G. Ivanov // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 405. – Issue 2. – P. 141–144.
56. Yarmoluk, S. M. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XXI. Arguments for half-intercalation model of interaction / S. M. Yarmoluk, S. S. Lukashov, T. Y. Ogul'Chansky, M. Y. Losytsky, O. S. Korniyushyna // *Biopolymers.* – 2001. – V. 62. – Issue 4. – P. 219–227.
57. Eriksson, M. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: dissociation rates in free solution and electrophoresis gels / M. Eriksson, H. J. Karlsson, G. Westman, B. Akerman // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – Issue 21. – P. 6235–6242.
58. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* / B. Valeur. – Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002. – 381 p.
59. Armitage, B. A. Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation / B. A. Armitage // *Top. Curr. Chem.* – 2005. – V. 253. – P. 55–76.
60. Chowdhury, A. Characterization of Chiral H and J Aggregates of Cyanine Dyes Formed by DNA Templating Using Stark and Fluorescence Spectroscopies / A. Chowdhury, S. Wachsmann-Hogiu, P. R. Bangal, I. Raheem, L. A. Peteanu // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – V. 105. – Issue 48. – P. 12196–12201.

61. Seifert, J. L. Spontaneous Assembly of Helical Cyanine Dye Aggregates on DNA Nanotemplates / J. L. Seifert, R. E. Connor, S. A. Kushon, M. Wang, B. A. Armitage // *J. Am. Chem. Soc.* – 1999. – V. 121. – Issue 13. – P. 2987–2995.
62. Krishnamoorthy, G. Structure and dynamics of condensed DNA probed by 1,1'-(4,4,8,8-tetramethyl-4,8-diazaundecamethylene)bis[4-[[3-methylbenz-1,3-oxazol-2-yl]methylidene]-1,4-dihydroquinolinium]tetraiodide fluorescence / G. Krishnamoorthy, G. Duportail, Y. Mely // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – Issue 51. – P. 15277–15287.
63. Zipper, H. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications / H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – Issue 12. – P. 1–10(e103).
64. Dragan, A.I. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA / A. I. Dragan, R. Pavlovic, J. B. McGivney, J. R. Casas-Finet, E. S. Bishop, R. J. Strouse, M. A. Schenerman, C. D. Geddes // *J. Fluoresc.* – 2012. – V. 22. – Issue 4. – P. 1189–1199.
65. Yang, W. Evaluation of gold nanoparticles as the additive in real-time polymerase chain reaction with SYBRGreen I dye / W. Yang, L. Mi, X. Cao, X. Zhang, C. Fan, J. Hu // *Nanotechnology.* – 2008. – V. 19. – Issue 25. – P. 1–9(255101).
66. Diggle, C. P. Development of a rapid, small-scale DNA repair assay for use on clinical samples / C. P. Diggle, J. Bentley, A. E. Kiltie // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – Issue 15. – P. 1–6(e83).
67. Giglio, S. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR / S. Giglio, P. T. Monis, C. P. Saint // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – Issue 22. – P. (1–5)e136.
68. Евдокимов, Ю. М. Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК / Ю. М. Евдокимов, В. И. Салянов, С. В. Семенов, С. Г. Скуридин. – М.: Изд-во «Радиотехника», 2008. – 296 с.
69. Евдокимов, Ю. М. Наноконструкторы и наноконструкции на основе ДНК / Ю. М. Евдокимов, В. И. Салянов, С. В. Семенов, С. Г. Скуридин. – М.: Изд-во «САЙНС-ПРЕСС», 2010. – 254 с.

70. Cao, Y. C. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection / Y. C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin // *Science*. – 2002. – V. 297. – Issue 5586. – P. 1536–1540.
71. Di, J. A one-step method to construct a third-generation biosensor based on horseradish peroxidase and gold nanoparticles embedded in silica sol-gel network on gold modified electrode / J. Di, C. Shen, S. Peng, Y. Tu, S. Li // *Anal. Chim. Acta*. – 2005. – V. 553. – Issue 1-2. – P. 196–200.
72. Grubisha, D. S. Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels / D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H. Y. Park, J. Driskell, M. D. Porter // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – Issue 21. – P. 5936–5943.
73. Maxwell, D.J. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules / D. J. Maxwell, J. R. Taylor, S. Nie // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – Issue 32. – P. 9606–9612.
74. Duguet, E. Towards a versatile platform based on magnetic nanoparticles for in vivo applications / E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet, G. Goglio, A. Demourgues, J. Portier, F. Grasset, P. Veverka, E. Pollert // *Bull. Mater. Sci.* – 2006. – V. 29. – Issue 6. – P. 581–586.
75. Dobson, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery / J. Dobson // *Drug Develop. Res.* – 2006. – V. 67. – Issue 1. – P. 55–60.
76. Ghosh, P. Gold nanoparticles in delivery applications / P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, V. M. Rotello // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – V. 60. – Issue 11. – P. 1307–1315.
77. Brown, S. D. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin / S. D. Brown, P. Nativo, J. A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards, B. Venugopal, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham, N. J. Wheate // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – V. 132. – Issue 13. – P. 4678–4684.
78. Huang, X. Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold

- nanoparticles / X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed // *Photochem. Photobiol.* – 2006. – V. 82. – Issue 2. – P. 412–417.
79. Pissuwan, D. A golden bullet? Selective targeting of *Toxoplasma gondii* tachyzoites using antibody-functionalized gold nanorods / D. Pissuwan, S. M. Valenzuela, C. M. Miller, M. B. Cortie // *Nano Lett.* – 2007. – V. 7. – Issue 12. – P. 3808–3812.
80. Kang, B. Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis / B. Kang, M. A. Mackey, M. A. El-Sayed // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – V. 132. – Issue 5. – P. 1517–1519.
81. Cortie, M. B. Plasmonic heating and its possible exploitation in nanolithography / M. B. Cortie, N. Harris, M. J. Ford // *Physica B.* – 2007. – V. 394. – Issue 2. – P. 188–192.
82. Han, J. Facile synthesis of highly stable gold nanoparticles and their unexpected excellent catalytic activity for Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in water / J. Han, Y. Liu, and R. Guo // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – Issue 6. – P. 2060–2061.
83. Zhang, Z. F. Gold nanoparticle-catalyzed luminol chemiluminescence and its analytical applications / Z. F. Zhang, H. Cui, C. Z. Lai, L. J. Liu // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – Issue 10. – P. 3324–3329.
84. Dreaden, E. C. Beating cancer in multiple ways using nanogold / E. C. Dreaden, M. A. Mackey, X. Huang, B. Kang, M. A. El-Sayed // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – V. 40. – Issue 7. – P. 3391–3404.
85. Turkevich, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold / J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier // *Discuss. Faraday Soc.* – 1951. – V. 11. – P. 55–75.
86. Duff, D. G. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation / D. G. Duff, A. Baiker, P. P. Edwards // *Langmuir.* – 1993. – V. 9. – Issue 9. – P. 2301–2309.

87. Brust, M. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system / M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1994. – Issue 7. – P. 801–802.
88. Huang, X. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications / X. Huang, S. Neretina, M. A. El-Sayed // *Adv. Mater.* – 2009. – V. 21. – Issue 48. – P. 4880–4910.
89. Huang, X. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy / X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed // *Nanomedicine (Lond)*. – 2007. – V. 2. – Issue 5. – P. 681–693.
90. Jain, P. K. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine / P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110. – Issue 14. – P. 7238–7248.
91. Хлебцов, Н. Г. Оптические свойства коллоидного золота и его конъюгатов с биоспецифическими макромолекулами / Н. Г. Хлебцов, В. А. Богатырев, Л. А. Дыкман, А. Г. Мельников // *Коллоид. журн.* – 1995. – Т. 57. – С. 412–423.
92. Link, S. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals / S. Link, M. A. El-Sayed // *Int. Rev. Phys. Chem.* – 2000. – V. 19. – Issue 3. – P. 409–453.
93. Jain, P. K. Plasmon coupling in nanorod assemblies: optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model / P. K. Jain, S. Eustis, M. A. El-Sayed // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110. – Issue 37. – P. 18243–18253.
94. Mirkin, C. A. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials / C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff // *Nature*. – 1996. – V. 382. – Issue 6592. – P. 607–609.
95. Elghanian, R. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles / R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin // *Science*. – 1997. – V. 277. – Issue 5329. – P. 1078–1081.

96. Li, H. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles / H. Li, L. Rothberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – Issue 39. – P. 14036–14039.
97. Boisselier, E. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity / E. Boisselier, D. Astruc // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – V. 38. – Issue 6. – P. 1759–1782.
98. Zinchenko, A. A. Single-chain compaction of long duplex DNA by cationic nanoparticles: modes of interaction and comparison with chromatin / A. A. Zinchenko, T. Sakaue, S. Araki, K. Yoshikawa, D. Baigl // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – V. 111. – Issue 11. – P. 3019–3031.
99. Goodman, C. M. DNA-binding by Functionalized Gold Nanoparticles: Mechanism and Structural Requirements / C. M. Goodman, N. S. Chari, G. Han, R. Hong, P. Ghosh, V. M. Rotello // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2006. – V. 67. – Issue 4. – P. 297–304.
100. Prado-Gotor, R. A kinetic study of the interaction of DNA with gold nanoparticles: mechanistic aspects of the interaction / R. Prado-Gotor, E. Grueso // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2011. – V. 13. – Issue 4. – P. 1479–1489.
101. Liu, Y. Gold-cluster degradation by the transition of B-DNA into A-DNA and the formation of nanowires / Y. Liu, W. Meyer-Zaika, S. Franzka, G. Schmid, M. Tsoli, H. Kuhn // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2003. – V. 42. – Issue 25. – P. 2853–2857.
102. Schmid, G. The relevance of shape and size of Au₅₅ clusters / G. Schmid // *Chem. Soc. Rev.* – 2008. – V. 37. – Issue 9. – P. 1909–1930.
103. Li, K. Nanoparticles inhibit DNA replication by binding to DNA: modeling and experimental validation / K. Li, X. Zhao, B. K. Hammer, S. Du, Y. Chen // *ACS Nano.* – 2013. – V. 7. – Issue 11. – P. 9664–9674.
104. Dulkeith, E. Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects / E. Dulkeith, A. C. Morteani, T. Niedereichholz, T. A. Klar, J. Feldmann, S. A. Levi, F. C. van Veggel, D. N. Reinhoudt, M. Moller, D. I. Gittins // *Phys. Rev. Lett.* – 2002. – V. 89. – Issue 20. – P. 203002-1–4.

105. Xu, Q. Superquenching acridinium ester chemiluminescence by gold nanoparticles for DNA detection / Q. Xu, J. Liu, Z. He, S. Yang // *Chem. Commun. (Camb.)* – 2010. – V. 46. – Issue 46. – P. 8800–8802.
106. Fan, C. Beyond superquenching: hyper-efficient energy transfer from conjugated polymers to gold nanoparticles / C. Fan, S. Wang, J. W. Hong, G. C. Bazan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – Issue 11. – P. 6297–6301.
107. Bunz, U. H. Gold nanoparticle-fluorophore complexes: sensitive and discerning "noses" for biosystems sensing / U. H. Bunz, V. M. Rotello // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2010. – V. 49. – Issue 19. – P. 3268–3279.
108. Ray, P. C. Gold Nanoparticle Based FRET for DNA Detection / P. C. Ray, G. K. Darbha, A. Ray, J. Walker, W. Hardy // *Plasmonics.* – 2007. – V. 2. – Issue 4. – P. 173–183.
109. Acuna, G. P. Distance dependence of single-fluorophore quenching by gold nanoparticles studied on DNA origami / G. P. Acuna, M. Bucher, I. H. Stein, C. Steinhauer, A. Kuzyk, P. Holzmeister, R. Schreiber, A. Moroz, F. D. Stefani, T. Liedl, F. C. Simmel, P. Tinnefeld // *ACS Nano.* – 2012. – V. 6. – Issue 4. – P. 3189–3195.
110. Sperling, R. A. Biological applications of gold nanoparticles / R. A. Sperling, P. Rivera Gil, F. Zhang, M. Zanella, W. J. Parak // *Chem. Soc. Rev.* – 2008. – V. 37. – Issue 9. – P. 1896–1908.
111. Malicki, M. Excited-state dynamics and dye-dye interactions in dye-coated gold nanoparticles with varying alkyl spacer lengths / M. Malicki, J. M. Hales, M. Rumi, S. Barlow, L. McClary, S. R. Marder, J. W. Perry // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2010. – V. 12. – Issue 23. – P. 6267–6277.
112. Kotiaho, A. Photoinduced Energy and Charge Transfer in Layered Porphyrin-Gold Nanoparticle Thin Films / A. Kotiaho, R. Lahtinen, H. Lehtivuori, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen // *J. Phys. Chem. C.* – 2008. – V. 112. – Issue 27. – P. 10316–10322.

113. Barazzouk, S. Photoinduced electron transfer between chlorophyll a and gold nanoparticles / S. Barazzouk, P. V. Kamat, S. Hotchandani // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – V. 109. – Issue 2. – P. 716–723.
114. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J. R. Lakowicz. – 3d ed. – New York: Springer Science + Business Media LLC, 2006. – 954 p.
115. Агранович, В. М. Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах / В. М. Агранович, М. Д. Галанин. – М.: Наука, Гл. ред. физ-мат литературы, 1978. – 383 с.
116. Ling, J. Energy transfer with gold nanoparticles for analytical applications in the fields of biochemical and pharmaceutical sciences / J. Ling, C. Z. Huang // *Anal. Methods.* – 2010. – Issue 2. – P. 1439–1447.
117. Chance, R. R. Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces / R. R. Chance, A. Prock, R. Silbey. – In the book *Advances in chemical physics.* – Editors I. Prigogine, S. A. Rice. – New York: John Wiley&Sons Inc., 1978. – 397 p.
118. Persson, B. N. J. Electron-hole-pair quenching of excited states near a metal / B. N. J. Persson, N. D. Lang // *Phys. Rev. B.* – 1982. – V. 26. – Issue 10. – P. 5409–5415.
119. Yun, C. S. Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier / C. S. Yun, A. Javier, T. Jennings, M. Fisher, S. Hira, S. Peterson, B. Hopkins, N. O. Reich, G. F. Strouse // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – Issue 9. – P. 3115–3119.
120. Wang, W. Aptamer biosensor for protein detection using gold nanoparticles / W. Wang, C. Chen, M. Qian, X. S. Zhao // *Anal. Biochem.* – 2008. – V. 373. – Issue 2. – P. 213–219.
121. Zhang, J. Aptamer-based multicolor fluorescent gold nanoprobe for multiplex detection in homogeneous solution / J. Zhang, L. Wang, H. Zhang, F. Boey, S. Song, C. Fan // *Small.* – 2010. – V. 6. – Issue 2. – P. 201–204.
122. Mayilo, S. Long-range fluorescence quenching by gold nanoparticles in a sandwich immunoassay for cardiac troponin T / S. Mayilo, M. A. Kloster, M. Wunderlich, A. Lutich, T. A. Klar, A. Nichtl, K. Kurzinger, F. D. Stefani, J. Feldmann // *Nano Lett.* – 2009. – V. 9. – Issue 12. – P. 4558–4563.

123. Mayilo, S. Competitive homogeneous digoxigenin immunoassay based on fluorescence quenching by gold nanoparticles / S. Mayilo, B. Ehlers, M. Wunderlich, T. A. Klar, H. P. Josel, D. Heindl, A. Nichtl, K. Kurzinger, J. Feldmann // *Anal. Chim. Acta.* – 2009. – V. 646. – Issue 1-2. – P. 119–122.
124. Yevdokimov, Y. M. Invite Article: The Liquid-Crystalline Phases of Double-Stranded Nucleic Acids in Vitro and in Vivo / Y. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, V. I. Salyanov // *Liq. Crystals.* – 1988. – V. 3. – Issue 11. – P. 1443–1459.
125. Magde, D. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields / D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – V. 75. – Issue 4. – P. 327–334.
126. Kang, J. Study on the interaction of new water-soluble porphyrin with DNA / J. Kang, H. Wu, X. Lu, Y. Wang, L. Zhou // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2005. – V. 61. – Issue 9. – P. 2041–2047.
127. Novikov, N. V. DNA-interaction study with water soluble tetra-cationic porphyrins / N. V. Novikov, E. S. Lisitsyna, N. A. Bragina, A. F. Mironov, V. A. Kuzmin // *J. Porphyrins Phthalocyanines.* – 2008. – V. 12. – Issue 3. – P. 659–660.
128. Abuin, E. Binding of Rose Bengal to bovine serum albumin / E. Abuin, A. Aspee, E. Lissi, L. Leon // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2007. – V. 52. – Issue 2. – P. 1196–1197.
129. Pescitelli, G. Theoretical analysis of the porphyrin-porphyrin exciton interaction in circular dichroism spectra of dimeric tetraarylporphyrins / G. Pescitelli, S. Gabriel, Y. Wang, J. Fleischhauer, R. W. Woody, N. Berova // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – Issue 25. – P. 7613–7628.
130. Lee, Y.-A. Binding Mode of meso-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin to Poly[d(I-C)2]: Effect of Amino Group at the Minor Groove of Poly[d(G-C)2] on the Porphyrin–DNA Interaction / Y.-A. Lee, S. Lee, T.-S. Cho, C. Kim, S. W. Han, S. K. Kim // *J. Phys. Chem. B.* – 2002. – V. 106. – Issue 43. – P. 11351–11355.
131. Лисицына, Е. С. Самогашение флуоресценции красителя SYBRGreen в комплексе с ДНК и в молекулярно организованных системах ДНК / Е. С.

- Лисицына, Н. А. Дурандин, Д. Н. Калюжный, В. А. Кузьмин // *Химия высоких энергий*. – 2013. – Т. 47. – Вып. 1. – С. 39–43.
132. Jares-Erijman, E. A. FRET imaging / E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – V. 21. – Issue 11. – P. 1387–1395.
133. Chan, F. T. S. HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells / F. T. S. Chan, C. F. Kaminski, G. S. Kaminski Schierle // *ChemPhysChem.* – 2011. – V. 12. – Issue 3. – P. 500–509.
134. Zhuang, X. Fluorescence quenching: A tool for single-molecule protein-folding study / X. Zhuang, T. Ha, H. D. Kim, T. Centner, S. Labeit, S. Chu // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – Issue 26. – P. 14241–14244.
135. Ермолаев, В. Л. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения / В. Л. Ермолаев, Е. Н. Бодунов, Е. Б. Свешникова, Т. А. Шахвердов; под общ. ред. М. Д. Галанина. – Ленинград: Изд-во «Наука», 1977. – 311 с.
136. Wojarski, C. Further generalization of the theory of concentration depolarization of photoluminescence / C. Wojarski // *J. Lumin.* – 1974. – V. 9. – Issue 1. – P. 40–44.
137. Lopez Arbeloa, F. Fluorescence self-quenching of the molecular forms of rhodamine B in aqueous and ethanolic solutions / F. Lopez Arbeloa // *J. Lumin.* – 1989. – V. 44. – Issue 1-2. – P. 105–112.
138. Kasha, M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates / M. Kasha // *Radiat. Res.* – 1963. – V. 20. – Issue 1. – P. 55–70.
139. Magde, D. Solvent Dependence of the Fluorescence Lifetimes of Xanthene Dyes / D. Magde, G. E. Rojas, P. G. Seybold // *Photochem. Photobiol.* – 1999. – V. 70. – Issue 5. – P. 737–744.
140. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions / G. Scatchard // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1949. – V. 51. – P. 660–672.
141. Manning, G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides / G. S. Manning // *Q. Rev. Biophys.* – 1978. – V. 11. – Issue 2. – P. 179–246.

142. Лисицына, Е. С. Супертушение флуоресценции красителя SYBRGreen в комплексе с ДНК под действием наночастиц золота / Е. С. Лисицына, О. Н. Лыго, Н. А. Дурандин, О. В. Дементьева, В. М. Рудой, В. А. Кузьмин // Химия высоких энергий. – 2012. – Т. 46. – Вып. 6. – С. 458–463.
143. Kuzmin, M.G. Microphase Mechanism of "Superquenching" of Luminescent Probes in Aqueous Solutions of DNA and Some Other Polyelectrolytes / M. G. Kuzmin, I. V. Soboleva, N. A. Durandin, E. S. Lisitsyna, V. A. Kuzmin // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V. 118. – Issue 15. – P. 4245–4252.
144. Dahlquist, F.W. The quantitative interpretation of maximum in Scatchard plots / F. W. Dahlquist // FEBS Lett. – 1974. – V. 49. – Issue 2. – P. 267–268.
145. Ipe, B. I. Photoinduced Charge Separation in a Fluorophore-Gold Nanoassembly / B. I. Ipe, K. G. Thomas // J. Phys. Chem. B. – 2002. – V. 106. – Issue 1. – P. 18–21.
146. Goodman, A. Effect of length, topology, and concentration on the microviscosity and microheterogeneity of DNA solutions / A. Goodman, Y. Tseng, D. Wirtz // J. Mol. Biol. – 2002. – V. 323. – Issue 2. – P. 199–215.