

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ»
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

УДК 535.37; 547.97; 577.112.4; 577.113.4

ФАНЬ ФАНЬ

**СИНТЕЗ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИОКОНЬЮГАТОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.04 – физическая химия

Минск, 2025

Научная работа выполнена в государственном научном учреждении «ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ».

Научный руководитель:

Шманай Вадим Владимирович,

кандидат химических наук, доцент, заведующий лабораторией химии биоконъюгатов государственного научного учреждения «ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Официальные оппоненты:

Артемьев Михаил Валентинович,

доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией нанохимии Учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»

Шутова Татьяна Геннадьевна,

кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник государственного научного учреждения «ИНСТИТУТ ХИМИИ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Оппонирующая организация:

Государственное научное учреждение «ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Защита состоится «5» декабря 2025 г. в 14:00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.24.01 при государственном научном учреждении «ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Сурганова, 13, к. 402. e-mail: secr@ifoch.bas-net.by, тел./факс +375 (17) 379-16-32.

С диссертацией можно ознакомиться в государственном научном учреждении «ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ».

Автореферат разослан «03» ноября 2025 г.

Учёный секретарь

Совета по защите диссертаций,
кандидат химических наук



С.А. Праценко

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы, по мере развития молекулярной биологии, биомедицины и органической химии, исследованием и применением высокочувствительных неизотопных методов детектирования биомолекул занимаются ученые из разных стран. В настоящее время исследования в этом направлении в основном направлены на анализ биомолекул, в основном, нуклеиновых кислот и белков. Для изучения свойств, взаимодействий и трансформаций биомолекул широко применяются различные метки, среди которых наиболее распространены флуоресцентные как безопасная альтернатива радиоактивным. Флуоресцентное мечение широко применяется в обнаружении веществ внутри клеток, в ранней клинической диагностике, генетических исследованиях и т.д. Наибольшим преимуществом флуоресцентного мечения являются простота, стабильность и безвредность. Правильный выбор флуоресцентного красителя и метода конъюгации обеспечивают высокую чувствительность и селективность детекции целевых биомолекул (ДНК, белков) в сложных биологических образцах.

К настоящему времени разработаны, охарактеризованы и широко применяются следующие красители и их производные: флуоресцеин в форме флуоресцеин-изотиоцианата (FITC), карбоксифлуоресцеин (FAM) в виде активированного эфира, азида и амидофосфита, тетрахлорфлуоресцеин (TET) и гексахлорфлуоресцеин (HEX); родамины: тетраметилродамин (TAMRA); N,N'-диэтил-2,7-диметилродамин (R6G). Флуоресцеины и родамины относятся к ксантоновым красителям. Другой большой класс флуоресцентных красителей – цианиновые красители торговых марок Cy3, Cy5 и Cy7. Все вышеописанные, а также многие другие флуоресцентные красители являются востребованными метками, поскольку каждый краситель обладает уникальным набором физико-химических свойств, что определяет область их применения.

В связи с этим более глубокое исследование и установление свойств и характеристик уже известных красителей, как в свободном виде, так и в составе биоконъюгатов, имеет большое значение и актуальность. Методам конъюгации флуоресцентных красителей с биомолекулами зачастую не уделяют должного внимания с точки зрения их важности при дизайне биоматериалов, несмотря на их ключевую роль во влиянии на биологическую активность. Оптимального метода конъюгации не существует, и конкретные методы конъюгации тщательно подбираются в зависимости от используемого материала и конечного применения; и наилучший метод в одном случае может оказаться совершенно неподходящим для другого. Прежде чем начинать разработку флуоресцентных биоконъюгатов, необходимо учесть такие ключевые факторы как селективность конъюгации, эффективность и скорость реакции, ортогональность к другим модификациям, доступность реакционных партнеров и т.д.

Метод резонансного переноса энергии (*Förster resonance energy transfer*,

FRET) стал мощным инструментом для контроля изменений нанометровых расстояний внутри биомолекул и между ними в живых организмах и *in vitro*. Он широко применяется в анализе взаимодействия биомолекул, исследованиях физиологии клеток, иммуноанализе, ПЦР в режиме реального времени и др., что делает актуальным получение новых знаний о FRET.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами.

Диссертационная работа соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы 2. *Химический синтез и продукты* и 3. *Биологические системы и технологии* (утверждены постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190), а также приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 годы 5. *Химические технологии, нефтехимия: производство новых химических продуктов* (утверждены Указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166). Диссертационная работа соответствует приоритетному направлению научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021 – 2025 годы 2. *Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: тонкий химический синтез* (утверждено Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156);

Цель и задачи исследования. Целью работы является установление физико-химических свойств и зависимости структура-свойства ксантеновых и цианиновых красителей и их новых функциональных производных, применяемых для мечения белков и ДНК-олигонуклеотидов, а также их физико-химических свойств в составе биоконъюгатов, в различных условиях.

Указанные цели достигаются решением следующих задач:

1. Разработка бифлуорофоров с усиленной флуоресценцией на основе анализа физико-химических свойств двух изомеров карбоксифлуоресцеина, установление люминесцентных свойств бифлуорофоров.
2. Получение конъюгатов синтезированных бифлуорофоров карбоксифлуоресцеина с белками и ДНК-олигонуклеотидами и установление их физико-химических характеристик в зависимости от их структуры и состава раствора;
3. Установление физико-химических свойств цианиновых красителей Су3 и Су5, обусловленных их растворимостью и цис-транс изомеризацией;

4. Установление зависимости флуоресцентных свойств конъюгатов олигонуклеотидов с цианиновыми красителями Cy5 и Cy7 от структуры связывающего их линкера;
5. Исследование изменения флуоресцентных свойств интеркаляционного красителя Sybr Green I в результате межмолекулярных взаимодействий с ДНК-дуплексами в условиях безызлучательного переноса энергии (Homo-FRET).

Объектом исследования являются флуоресцентные красители ксантенового и цианинового рядов, а также их конъюгаты с белками и синтетическими ДНК-олигонуклеотидами. **Предметом исследования** являются физико-химические характеристики флуоресцентных красителей указанных классов, а также их конъюгатов с биомолекулами.

Научная новизна.

1. Разработаны бифлуорофоры на основе 3,5-диаминобензойной кислоты — (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ — с оптимизированной пространственной конфигурацией, минимизирующей самотушение за счет подавления конформационной перестройки и внутримолекулярных взаимодействий. Выявлена повышенная стабильность спектральных характеристик (5-FAM)₂ по сравнению с (6-FAM)₂, обусловленная стерическими факторами, а наличие изобестических точек подтверждает сложный характер фотофизических процессов в данных системах, при этом выявлены различия в поведении изомеров 5- и 6-карбоксифлуоресцеина, обусловленные стерическими факторами.
2. Продемонстрировано применение азид-алкинового циклоприсоединения для сайт-специфичного введения бифлуорофоров в биомолекулы. Установлено, что конъюгация с белками приводит к снижению относительного квантового выхода флуоресценции на 20-40%. Определены перспективы использования бифлуорофоров для мечения белков.
3. Впервые систематизированы данные о влиянии микроокружения (вязкость, содержание ПАВ) на флуоресцентные свойства цианиновых красителей Cy3 и Cy5 и обобщены эффекты растворимости, внутримолекулярной свободы вращения (цис-транс-изомеризации) и конъюгации с олигонуклеотидами на их свойства.
4. Впервые синтезирован ряд производных Cy5 и Cy7 с линкерами разной структуры и проведен сравнительный анализ их флуоресцентных характеристик в конъюгатах с ДНК. Установлена зависимость максимумов поглощения и флуоресценции, Стоксова сдвига и интенсивности флуоресценции от положения и длины линкера, а также типа нуклеиновой кислоты (одноцепочечная/двухцепочечная).

5. Впервые экспериментально доказана возможность использования гомологичного флуоресцентно-резонансного переноса энергии (Homo-FRET) для исследования интеркаляции красителя Sybr Green I в ДНК. Установлены количественные корреляции между концентрацией красителя, анизотропией флуоресценции и временем жизни возбужденного состояния, что расширяет методическую базу для изучения ДНК-белковых взаимодействий.

Положения, выносимые на защиту:

1. Молекулярный дизайн карбоксифлуоресцеиновых бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ на основе 3,5-диаминобензойной кислоты с оптимальной геометрией молекулы для минимизации самотушения, получение их конъюгатов с биомолекулами и их физико-химические свойства; установленное влияние свойств раствора (такие как значение рН, вязкость, температура, присутствие катионов) на спектры поглощения, флуоресценции и относительные квантовые выходы флуоресценции моно- и бифлуорофоров; выявленное явление самотушения, вызванное конформационной перестройкой и внутримолекулярными взаимодействиями бифлуорофоров, что приводит к большей стабильности спектральных свойств (5-FAM)₂ по сравнению с (6-FAM)₂; установленное наличие изобестических точек для двух исследованных бифлуорофоров.

2. Установленное минимальное самотушение, вызванное внутримолекулярными взаимодействиями двух молекул флуоресцеина, введенных в один сайт биомолекулы с помощью бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ по реакции азид-алкинового циклоприсоединения; флуоресцентные свойства мономерных изомеров (5- и 6-) карбоксифлуоресцеина и их бифлуорофоров в составе белковых конъюгатов, а также снижение относительного квантового выхода флуоресценции исследованных флуорофоров в составе конъюгатов на 20-40%.

3. Влияние растворимости и вращательных степеней свободы, обусловленных вязкостью и присутствием поверхностно-активных веществ, на эффективность флуоресценции цианиновых красителей Cy3 и Cy5; сравнительный анализ эффективности флуоресценции двух цианиновых красителей с их производными, содержащими сульфонильные заместители; установленная максимальная интенсивность флуоресценции цианиновых красителей в составе олигонуклеотидных конъюгатов.

4. Результаты сравнительного анализа флуоресцентных свойств новых синтезированных производных цианиновых красителей Cy5 и Cy7 с линкерами различной структуры в составе конъюгатов с одно- и двухцепочечной ДНК.

5. Установленная зависимость интенсивности, анизотропии флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния от соотношения концентраций красителя флуоресцентного красителя Sybr Green I, интеркалированного в двух-

цепочечную ДНК, в условиях гомологичного флуоресцентно-резонансного переноса энергии (Homo-FRET).

Личный вклад соискателя состоит в выполнении экспериментальной части работы, разработке методик, установлении и доказательстве структуры синтезированных соединений, определении люминесцентных характеристик красителей и их биоконъюгатов, анализе литературных данных. Планирование исследований, постановка задач и подготовка материалов для научных публикаций осуществлялась совместно с научным руководителем к.х.н. Шманаем В.В. Анализ результатов исследования физико-химических свойств красителей проведен совместно с д.ф.-м.н., Поведайло В.А (Институт физики НАН Беларуси).

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Материалы диссертационной работы представлены на XIII Международной научно-технической конференции «Квантовая электроника» (Минск, 2021 и 12th international conference on photonics and applications (ICPA-12) (Vung Tau, Vietnam, 2022). Полученные результаты использованы при выполнении 2 заданий и 2 мероприятий госпрограмм, а также хозяйственных работ с Курчатовским институтом и Сколковским институтом науки и технологий (Россия).

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 8 научных работах, в том числе в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях общим объемом 5.8 авторского листа, и тезисах 2 докладов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и библиографического списка. Глава 1 посвящена анализу литературных данных по принципам флуоресценции и её применению в молекулярной биологии; синтезу и физико-химическим свойствам ксантеновых и цианиновых красителей, а также методам конъюгации с биомолекулами. Глава 2 содержит описание методик экспериментов, используемых реагентов и оборудования. В главе 3 представлены результаты и обсуждение флуоресцентных свойств бифлуорофоров флуоресцеина и их биоконъюгатов. В главе 4 представлены результаты и обсуждение физико-химических свойств цианиновых красителей и их биоконъюгатов. В главе 5 представлены результаты и обсуждение красителей, интеркалированных в дцДНК. Диссертационная работа изложена на 112 страниц, содержит 67 рисунков и 5 таблиц. Библиографический список включает 198 наименований и занимает 16 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Литературный обзор.

Обобщены литературные данные по получению и исследованию физико-химических свойств флуоресцентных биоконъюгатов, в том числе принципы явления флуоресценции и его применения в молекулярной биологии; флуоресцентные красители, применяемые для мечения биомолекул, а также методы конъюгации, используемые для мечения биомолекул.

Глава 2. Экспериментальная часть.

Представлена информация о материалах, оборудовании и приборах, использованных в эксперименте, математической обработке данных, а также методиках эксперимента.

Глава 3. Физико-химические свойства бифлуорофоров флуоресцеина в свободном виде и в составе биоконъюгатов.

Одной из важнейших характеристик флуоресцентных красителей, применяемых для мечения биомолекул, является интенсивность флуоресценции, поскольку в биоаналитике обычно используются низкие концентрации реагентов. Поскольку множественное мечение биомолекул нежелательно, так как это может влиять на их функции, поиск более ярких флуоресцентных красителей и установление зависимости физико-химических характеристик красителей в свободном виде и в составе биоконъюгатов от структуры молекулы, микроокружения и свойств раствора, является важной задачей.

Несколько молекул модификатора может быть введено в один сайт биомолекулы через разветвленную линкерную группу. При введении флуорофоров линкерная структура должна иметь определённую геометрию и быть достаточно жесткой, чтобы предотвратить сближение двух флуорофоров и образование димеров, что приводит к самотушению красителя и снижению квантового выхода флуорофора.

Красители на основе флуоресцеина, прежде всего производные карбоксифлуоресцеина, - наиболее часто используемые флуоресцентные красители в биоаналитике.

Нами разработан дизайн бифлуорофоров флуоресцеина на скаффолде 3,5-диаминобензойной кислоты, который позволяет вводить два флуорофора в один сайт модификации биомолекулы с незначительной потерей квантового выхода (рисунок 1) [1-А; 2-А; 7-А].

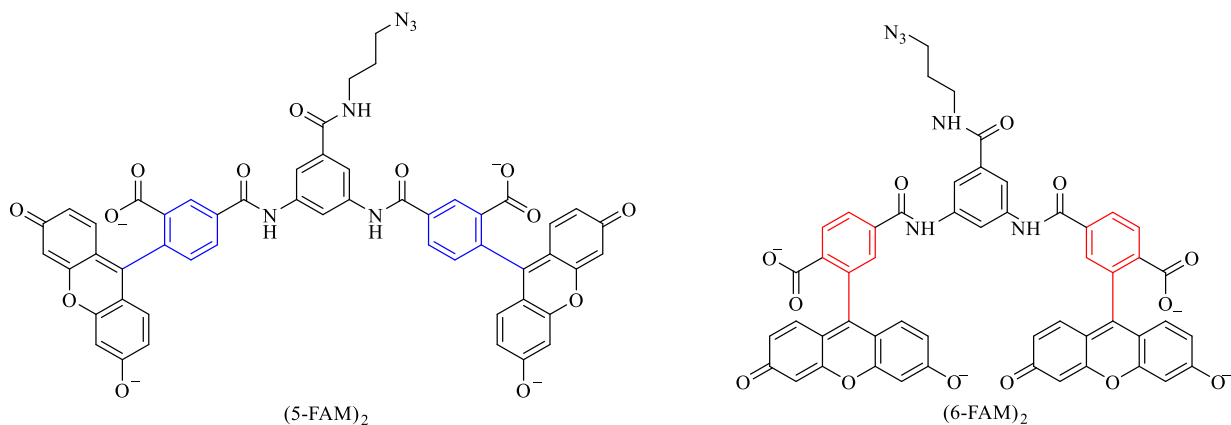


Рисунок 1 – Структура анионной формы бифлуорофоров флуоресцеина

3.1 Свойства бифлуорофоров флуоресцеина

В результате измерения энергетических характеристик полученных красителей установлено, что в буферном растворе с $\text{pH} = 8.5$ квантовый выход флуоресценции $(5\text{-FAM})_2$ в 2.4 раза выше, чем у $(6\text{-FAM})_2$ (0.65 и 0.27 соответственно).

Вязкость среды - важнейший фактор, влияющий на конформационную подвижность частей молекулы, что должно сказываться на флуоресцентных свойствах всей структуры. Установлено, что тушение флуоресценции для $(6\text{-FAM})_2$ по сравнению с $(5\text{-FAM})_2$ связано в основном с конформационной перестройкой молекул в возбужденном состоянии, которая в значительной степени контролируется вязкостью среды.

Для $(6\text{-FAM})_2$, даже при незначительном увеличении вязкости (нелинейный быстрый рост в диапазоне вязкости 0.89-10.00 сП) наблюдался резкий рост квантового выхода с последующим выходом на плато. Аналогичную форму графика наблюдали и для времени жизни возбужденного состояния τ (рисунок 2). Амфифильные соединения (ПАВ) Triton X-100 в водной среде при определенных концентрациях образуют мицеллы, вязкость микросреды которых значительно превышает вязкость раствора.

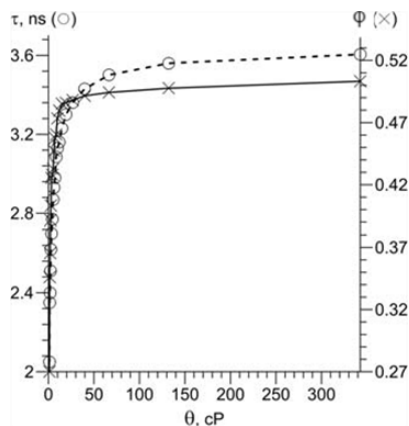


Рисунок 2 – Зависимость квантового выхода флуоресценции ϕ (x) и времени жизни возбужденного состояния τ (o) $(6\text{-FAM})_2$ от вязкости водно-глицериновой смеси

В результате изучения взаимодействия бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ с Triton X-100 установлено, что при превышении его концентрации выше критической концентрации мицеллообразования происходит резкое, почти линейное увеличение интенсивности флуоресценции (6-FAM)₂ (рисунок 3а), а квантовый выход флуоресценции (5-FAM)₂ остается почти неизменным с увеличением концентрации ПАВ (рисунок 3б). Время жизни возбужденного состояния τ (6-FAM)₂ резко возрастает с ростом концентрации TX-100, достигая величины 3.75 нс, а у (5-FAM)₂ остается равным 4.6 нс [1-А; 2-А; 7-А].

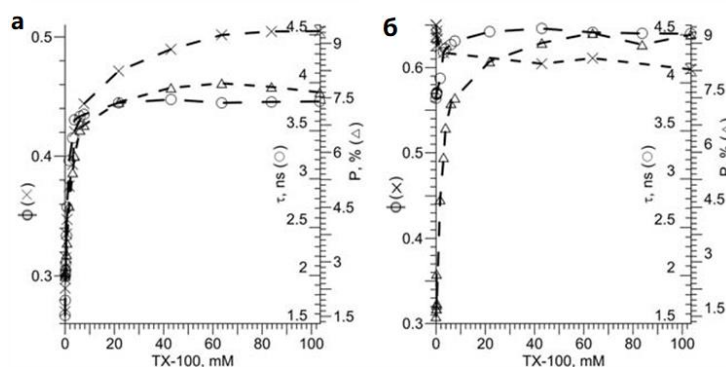


Рисунок 3 – Зависимость квантового выхода флуоресценции ϕ (\times), времени жизни возбужденного состояния τ (O) и поляризации флуоресценции $P\%$ (Δ) (6-FAM)₂ (а) и (5-FAM)₂ (б) от концентрации Triton X-100 в буферном растворе

Помимо влияния вязкости раствора на конформационную перестройку, важными факторами являются ионная сила, температура, наличие добавок. Так, присутствие двухзарядного катиона вызвало значительное снижение флуоресценции (6-FAM)₂, но не оказало влияния на (5-FAM)₂ (рисунок 4).

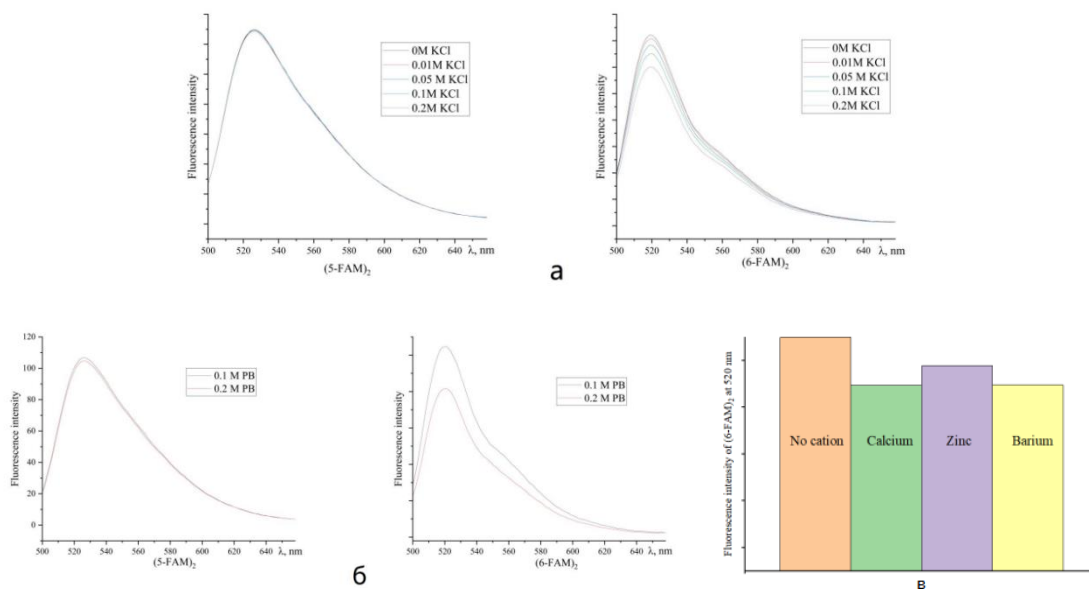


Рисунок 4 – а) Спектры флуоресценции (5-FAM)₂ (слева) и (6-FAM)₂ (справа) в различных концентрациях раствора KCl; б) Спектры флуоресценции (5-FAM)₂ (слева) и (6-FAM)₂ (справа) в различных концентрациях фосфатного буфера; в) Спектры флуоресценции (6-FAM)₂ в растворах, содержащих 5 мМ различных типов двухвалентных катионов

Исследование влияния температуры показало, что (6-FAM)₂ демонстрировал наиболее значительное снижение интенсивности флуоресценции при 60°C – примерно на 60% меньше по сравнению с 25°C (рисунок 5) [5-А].

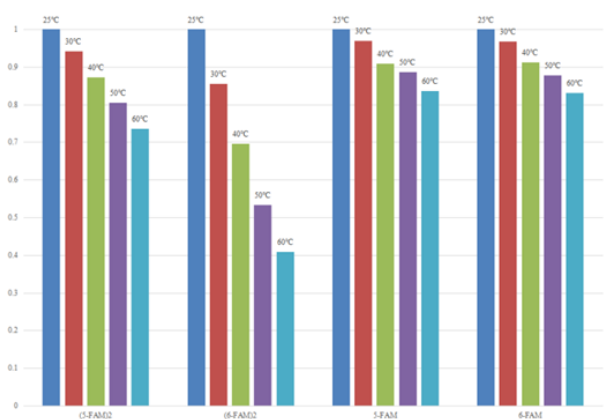


Рисунок 5 – Интенсивности флуоресценции (5-FAM)₂, (6-FAM)₂, 5-FAM и 6-FAM (слева направо) в диапазоне 25-60°C

При pH = 6.0-7.0 в спектрах поглощения бифлуорофоров наблюдалось не только изменение оптической плотности, но и изменение формы пиков, что указывает на присутствие кроме дианиона и моноаниона других типов протолитических форм, причем спектр флуоресценции (6-FAM)₂ (г) особенно чувствителен к снижению pH (рисунок 6) [5-А].

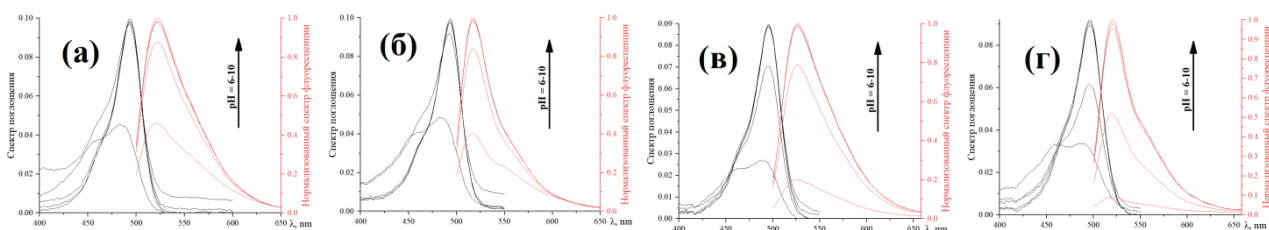


Рисунок 6 – Спектры поглощения и нормализованной флуоресценции 5-FAM (а), 6-FAM (б), (5-FAM)₂ (в) и (6-FAM)₂ (г) в фосфатных буферах при значениях pH 6-10 (пять растворов с интервалом pH 1)

Проведен анализ зависимости спектров поглощения от значения pH для установления наличия изобестических точек для бифлуорофоров (5-FAM)₂ (слева) и (6-FAM)₂ (справа). Для двух изомеров бифлуорофора в исследованной области изменения pH в спектрах поглощения зарегистрированы по одной изобестической точке. При значениях pH ниже 7.0 изобестическая точка в приведенных спектрах исчезает, показывая, что другие протолитические формы бифлуорофора участвуют в равновесии (рисунок 7) [5-А].

Полученные результаты подтверждают, что флуоресценция (6-FAM)₂ чувствительна к свойствам среды из-за структурных особенностей молекулы. В структуре (6-FAM)₂ две ксантеновые группы склонны к сближению при внутримолекулярном конформационном вращении, что оказывает влияние на эмиссию флуоресценции. Таким образом, (5-FAM)₂ обладает преимуществом

перед (6-FAM)₂ по квантовому выходу флуоресценции, времени жизни возбужденного состояния и меньшей чувствительности к свойствам раствора.

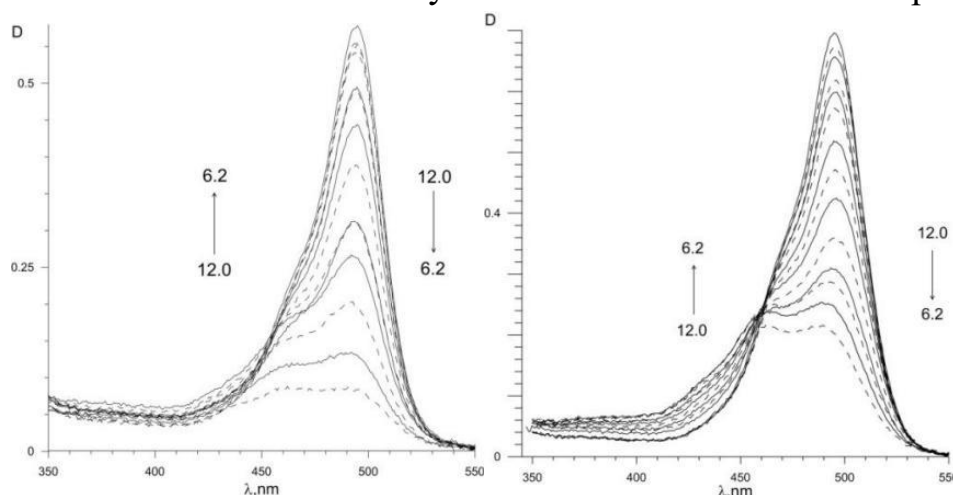


Рисунок 7 – Спектры поглощения (5-FAM)₂ (слева) и (6-FAM)₂ (справа) в фосфатных буферах при разных рН (интервал в диапазоне 6.2÷8.0 составляет 0.2, а в диапазоне 8.0÷12.0 – 1)

3.2 Физико-химические свойства конъюгатов бифлуорофоров флуоресцеина с белками

Среда раствора в биологических приложениях часто бывает труднопредсказуемой. Полученные результаты подтверждают чувствительность (6-FAM)₂ к изменениям среды, поэтому в последующих экспериментах по конъюгации с биомолекулами был использован только бифлуорофор (5-FAM)₂.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) и иммуноглобулин человека (IgG) были модифицированы с помощью (5-FAM)₂ и двух мономерных карбоксифлуоресцеинов, содержащих азидную группу (5-FAM-N₃ и 6-FAM-N₃), по реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Сравнение интенсивностей флуоресценции трех различных производных флуоресцеина показало, что квантовые выходы флуоресценции (5-FAM)₂, 5-FAM и 6-FAM значительно снижались после конъюгации с белками, особенно в случае БСА. Однако снижение квантового выхода флуоресценции (5-FAM)₂ компенсируется тем, что бифлуорофор обладает в 2 раза большим коэффициентом экстинкции. Конъюгаты бифлуорофора с IgG показали большую интенсивность флуоресценции по сравнению с конъюгатами мономерных карбоксифлуоресцеинов с тем же белком (таблица 1).

Таким образом, несмотря на то, что (5-FAM)₂ относительно более чувствителен к тушению некоторыми аминокислотами в белках, благодаря более высокому коэффициенту экстинкции, он не менее эффективен, чем мономерные карбоксифлуоресцеины. Это позволяет достичь поставленной цели – ввести больше флуорофоров в один участок модификации, что приводит к более высокой интенсивности флуоресценции [5-A].

Таблица 1 - Фотофизические свойства конъюгатов (5-FAM)₂, 5-FAM и 6-FAM с BSA и IgG

Биоконъюгат	Флуорофор	Соотношение квантовых выходов флуоресценции $\eta_{\text{конь/флуо}}$	Длина волны максимума спектра флуоресценции $\lambda_{\text{конь/флуо}}$, нм	Концентрация белкового конъюгата, мкМ	Интегральная область спектра флуоресценции
(5-FAM) ₂ -BSA	(5-FAM) ₂	0.20	533 / 525	0.682	1349
5-FAM-BSA	5-FAM	0.55	533 / 519	0.682	1702
6-FAM-BSA	6-FAM	0.49	526 / 516	0.682	1647
(5-FAM) ₂ -IgG	(5-FAM) ₂	0.50	530 / 525	0.238	2275
5-FAM-IgG	5-FAM	0.78	528 / 519	0.238	1726
6-FAM-IgG	6-FAM	0.79	523 / 516	0.238	1899

Глава 4. Флуоресцентные свойства цианиновых красителей.

4.1 Влияние растворимости и цис-транс-изомеризации на флуоресцентные свойства цианиновых красителей

Исследованы физико-химические свойства цианиновых красителей и их производных, известных под торговыми названиями Cy3 и Cy5 (рисунок 8). Цианиновые красители характеризуются не очень высоким квантовым выходом и широким диапазоном времен жизни возбужденных состояний. Установлено, что наличие сульфогруппы существенно улучшает флуоресцентные свойства Cy3, однако наибольший эффект наблюдался при связывании красителя с олигонуклеотидом (рисунок 9). Это объясняется двумя факторами, влияющими на флуоресценцию цианиновых красителей: безызлучательной дезактивацией возбужденного состояния из-за конформационных изменений и агрегацией в водном растворе из-за низкой растворимости [3-А].

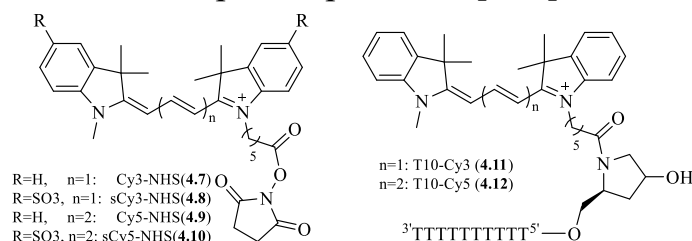


Рисунок 8 – Структуры Cy3, Cy5 и их производных, исследованных в данной работе

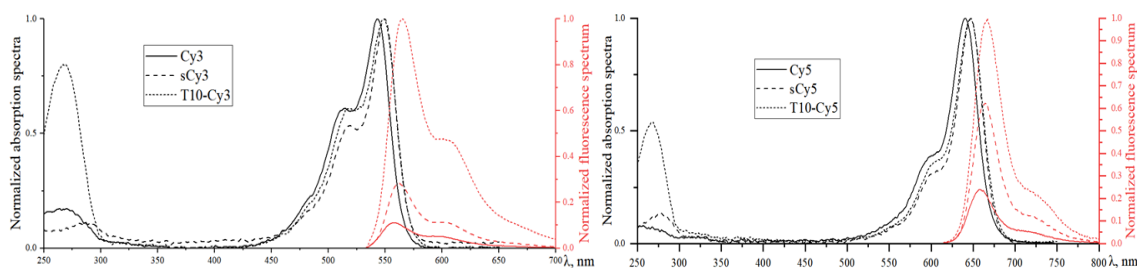


Рисунок 9 – Нормированные спектры поглощения и флуоресценции Cy3 и его производных (слева), Cy5 и его производных (справа) в PBS, pH = 7.4

Для изучения влияния растворимости Cy3 и Cy5 в качестве солюбилизатора использовали ПАВ Tween-20. В результате сравнения спектральных свойств Cy3 и Cy5 в буфере PBS без ПАВ и с 0.25% Tween-20 установлено, что в присутствии ПАВ эффективность флуоресценции Cy3 выше в 5.2 раза, а Cy5 – в 3.2 раза, тогда как в случае водорастворимых сульфированных красителей этот эффект не наблюдался (рисунок 10).

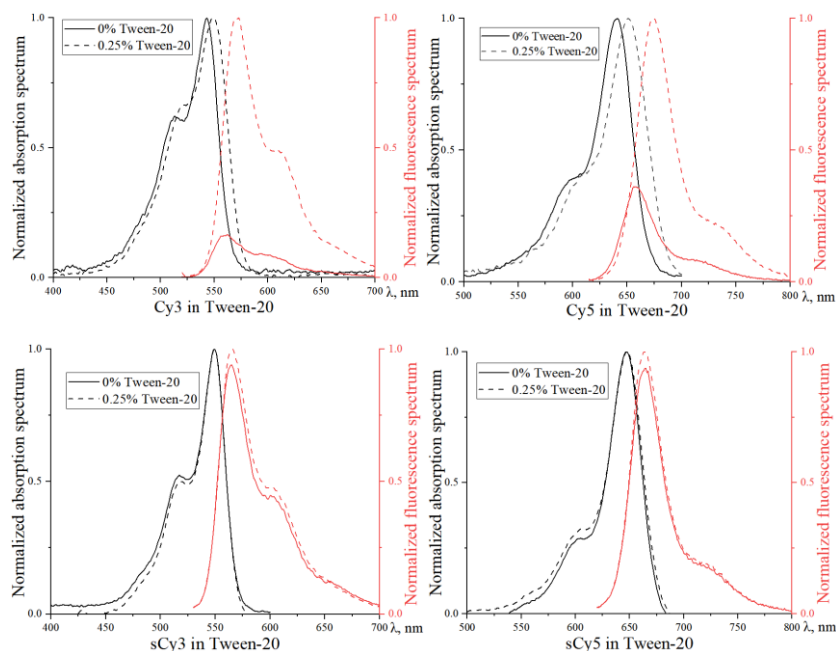


Рисунок 10 – Нормированные спектры поглощения и флуоресценции Cy3 (вверху слева) и Cy5 (вверху справа), sCy3 (внизу слева) и sCy5 (внизу справа) в буферном растворе с 0% и 0.25% Tween-20

Кроме растворимости, на эффективность флуоресценции цианиновых красителей значительно влияет цис-транс-изомеризация молекул красителя. Энергия активации изомеризации молекулы Cy5 выше, чем у Cy3, поскольку полиметиновая цепь в Cy5 длиннее, поэтому свойства раствора оказывают большее влияние на изомеризацию молекулы Cy3 по сравнению с Cy5. Измерение квантовых выходов Cy3 и Cy5 при комнатной температуре в растворе глицерина с массовой концентрацией 10-70% показало, что эффективность флуоресценции повышается по мере увеличения вязкости раствора. При этом увеличение эффективности флуоресценции было больше для Cy3, чем для Cy5 (рисунок 11) [3-А].

На основании анализа свойств конъюгатов цианиновых красителей с ДНК-олигонуклеотидами (Т10) можно установить причину их высокой флуоресцентной эффективности: существенное замедление внутримолекулярного вращения приводит к меньшей степени фотоизомеризации, а также высокая растворимость конъюгата по сравнению со свободным красителем. Для подтверждения этого предположения синтезированы конъюгаты полиэтиленгликоля (ПЭГ) с красителями.

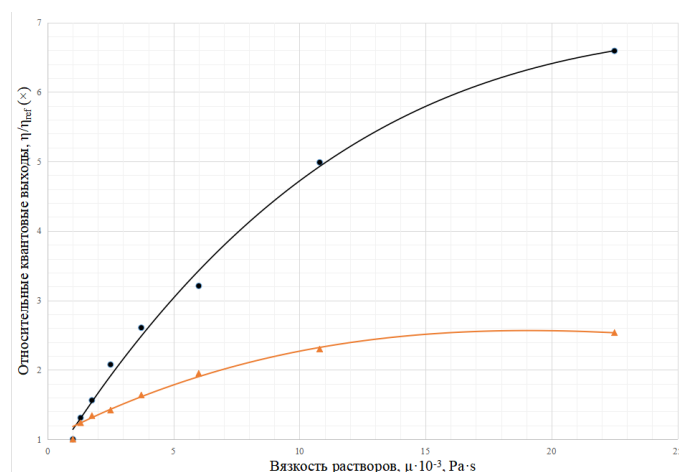


Рисунок 11 – Зависимость относительного квантового выхода от вязкости раствора, Cy3 (●) и Cy5 (▲) в водных растворах глицерина с различной концентрацией

Пегилирование красителей привело к заметному увеличению относительных квантовых выходов: Cy3-ПЭГ флуоресцировал в 2.5 раза сильнее, чем Cy3, а Cy5-ПЭГ – в 1.8 раза сильнее, чем его немодифицированный аналог (рисунок 12). Менее выраженный эффект от связывания с ПЭГом подтверждает, что взаимодействие между цианиновым красителем и одноцепочечной ДНК делает структуру красителя более стабильной, что обеспечивает максимальную интенсивность флуоресценции. Эти свойства красителя требуют осторожности при использовании Cy3 и Cy5 и их производных в качестве доноров-акцепторов для FRET из-за возможных ошибок [3-А].

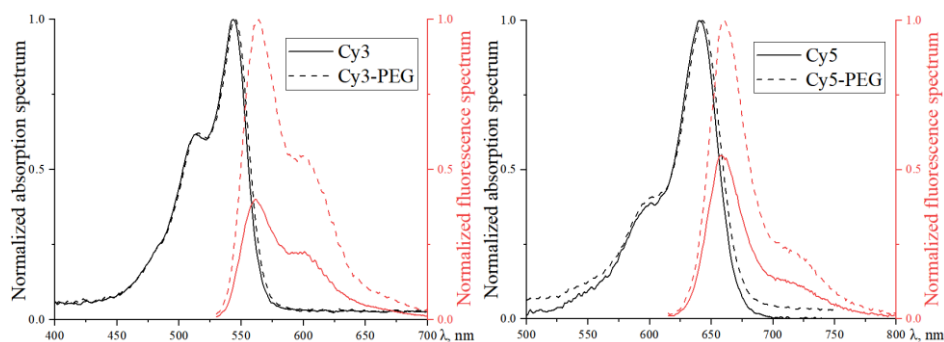


Рисунок 12 – Нормированные спектры поглощения и флуоресценции Cy3 (слева) и Cy5 (справа) после конъюгации с ПЭГ

4.2 Физико-химические свойства новых цианиновых красителей в составе конъюгатов с ДНК

Новые производные красителей Cy5 и Cy7 (рисунок 13), которые флуоресцируют в дальнем красном диапазоне и ближнем инфракрасном диапазоне, могут использоваться для визуализации биологических объектов в *in vivo* экспериментах, так как в этом диапазоне отсутствует фоновая флуоресценция.

В результате регистрации спектров поглощения исследованных красителей, имеющих одинаковую структуру флуорофора, но разные заместители,

установлено, что все Cy5 имеют максимум поглощения при длине волны около 640 нм, тогда как максимумы Cy7 с заместителем, присоединенным к азоту индольной структуры (Cy7-a и Cy7-b), составляют 756-757 нм, а с заместителем на метиновом мостике и содержащим атом серы (Cy7-c и Cy7-d) – около 776 нм. Максимумы поглощения Cy7-c,d примерно на 20 нм больше, чем у Cy7-a,b, что обусловлено наличием электронодонорной группы на метиновом мостике, что приводит к сдвигу в красную область (таблица 2) [6-А].

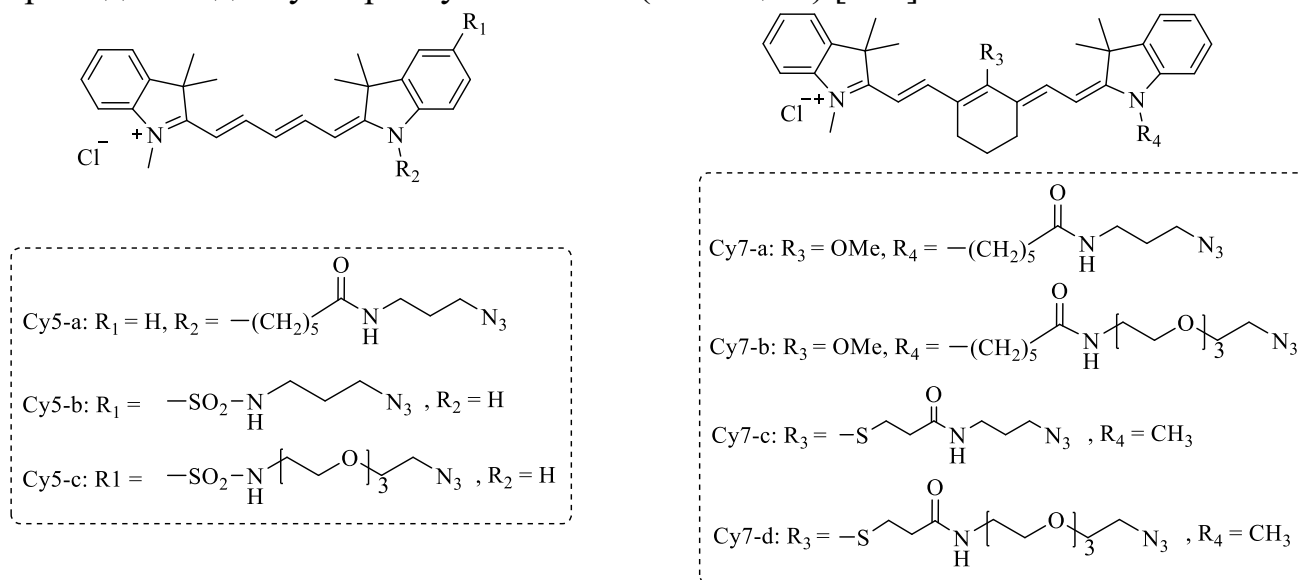


Рисунок 13 – Структуры производных Cy5 (слева) и Cy7 (справа)

Таблица 2 – Спектральные свойства красителей Cy5 и Cy7

Краситель	$\lambda_{\text{погл}}/\lambda_{\text{флуо}}$ (нм)	Стоксов сдвиг (нм)
Cy7-a	757 / 779	22
Cy7-b	756 / 779	23
Cy7-c	775 / 800	25
Cy7-d	777 / 800	23
Cy5-a	641 / 656	15
Cy5-b	639 / 655	16
Cy5-c	638 / 655	17

После конъюгации с ДНК с помощью реакции азидно-алкинового циклопроединения (CuAAC) спектры поглощения всех красителей в разной степени сдвигаются в длинноволновую область, причем больше для одноцепочечной ДНК чем для двухцепочечной. Связывание красителей Cy7 с ДНК существенно усиливает их флуоресценцию одинаково для двух- или одноцепочечной ДНК. Добавление дополнительных фрагментов триэтиленгликоля к заместителю значительно увеличивает флуоресценцию красителя за счет снижения агрегации (рисунок 14) [6-А].

Интенсивность флуоресценции красителя Cy5-b с коротким линкером сопоставима с описанным ранее Cy5-a, тогда как интенсивность флуоресценции

Cy5-с с олигоэтиленгликолевый линкером оказалась большей. Все исследованные красители Cy5 флуоресцировали сильнее в составе конъюгатов с одноцепочечной ДНК, чем с двухцепочечной (рисунок 15) [6-А].

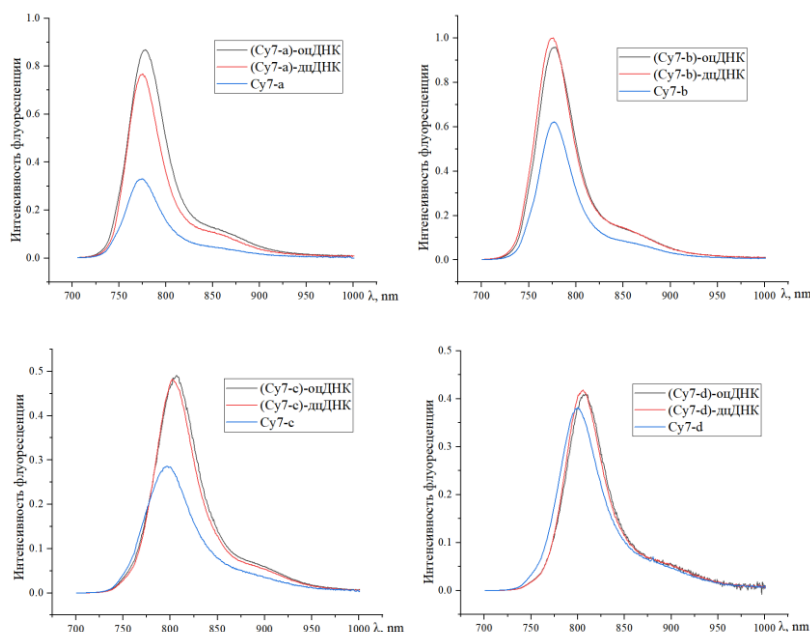


Рисунок 14 – Нормированные спектры флуоресценции четырех производных Cy7 и их конъюгатов с дцДНК или оцДНК (нормировано на максимальную интенсивность флуоресценции Cy7-b, конъюгированного с дцДНК, установленную как 1)

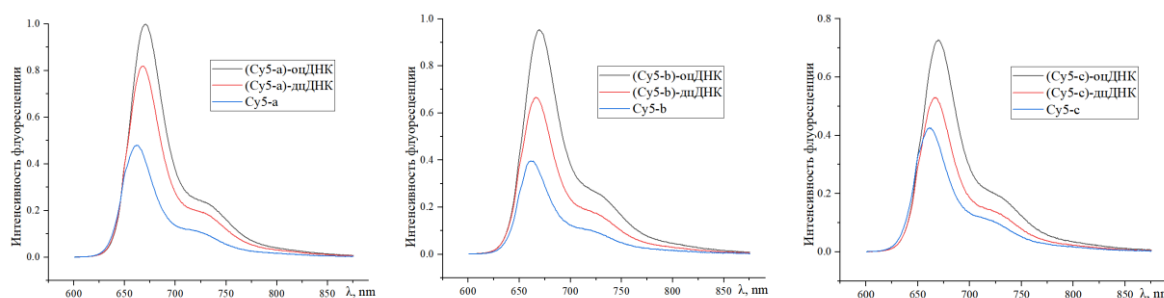


Рисунок 15 – Нормированные спектры флуоресценции трех производных Cy5 и их конъюгатов с дцДНК или оцДНК (нормировано на максимальную интенсивность флуоресценции конъюгата Cy5-a с оцДНК, установленную как 1)

Глава 5. Homo-FRET между молекулярными роторами, интеркалированными в ДНК.

С целью изучения процесса переноса энергии между молекулярными роторами выбраны короткоцепочечные олигонуклеотиды – фрагменты двухцепочечной ДНК с интеркалированными молекулами SG. В комплексах может происходить перенос энергии за счет сближения молекул хромофора при увеличении его концентрации. Так как в растворе всегда присутствует определенное количество молекул ДНК с одним интеркалированным SG, особенно при малых концентрациях, экспериментальные зависимости отражают суммы анизотропий. На рисунке 16 представлена зависимость интенсивности флуоресценции $I(1)$ и

анизотропия флуоресценции r (2) для дцДНК (20 пар оснований) с интеркалированными SG от соотношения концентраций $C_{SG}/C_{дцДНК}$.

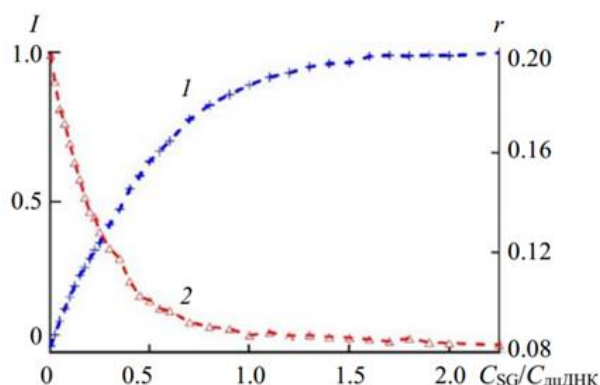


Рисунок 16 – Зависимость интенсивности флуоресценции I (1) и анизотропия флуоресценции r (2) от соотношения концентраций $C_{SG}/C_{дцДНК}$

Вначале наблюдается линейный рост интенсивности флуоресценции с увеличением концентрации красителя до $I \sim 0.5$, затем происходит нелинейное возрастание интенсивности с последующим выходом на плато. Начальный линейный рост интенсивности связан с ростом числа интеркалированных молекул SG, а дальнейшее непропорциональное возрастание интенсивности свидетельствует о наличии процессов концентрационного тушения флуоресценции SG и самотушения флуоресценции интеркалированного SG.

Осцилляторы поглощения и испускания интеркалированных молекул SG расположены перпендикулярно оси спиральных молекул дцДНК и под некоторым углом, зависящим от их взаимного расстояния. Снижение анизотропии флуоресценции обусловлено безызлучательным переносом энергии между интеркалированными молекулами SG по механизму FRET [4-А; 8-А].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Выполнен молекулярный дизайн и синтез карбоксифлуоресцеиновых бифлуорофоров $(5\text{-FAM})_2$ и $(6\text{-FAM})_2$ на основе 3,5-диаминобензойной кислоты и установлены их структурные и физико-химические свойства. Показано, что жесткая структура разветвленной линкерной группы минимизирует самотушение флуорофоров, вызванное внутримолекулярным безызлучательным переносом энергии, и установлено влияние значения pH, вязкости раствора, ионной силы и температуры на спектры поглощения, флуоресценции и относительные квантовые выходы флуоресценции моно- и бифлуорофоров, и показано, что флуоресцентные свойства $(6\text{-FAM})_2$ чувствительны к составу раствора, тогда как $(5\text{-FAM})_2$ мало зависит от свойств раствора [1-А; 2-А; 5-А; 7-А].

2. Установлено, что в составе белковых конъюгатов повышенный в два раза

коэффициент экстинкции $(5\text{-FAM})_2$ эффективно нивелирует наблюдаемое снижение относительного квантового выхода флуоресценции, что делает его перспективной меткой для биомолекул [1-А; 5-А].

3. Выявлены закономерности изменения интенсивности флуоресценции красителей Cy3 и Cy5 в различных условиях. Подтверждено, что цианиновые красители склонны к агрегации в водных растворах, и повышение их растворимости усиливает флуоресценцию в 3-5 раз. Кроме того, увеличение энергии активации *цис-транс* изомеризации в результате повышения вязкости раствора повышает квантовый выход флуоресценции в 3-7 раз; 4-10 кратное усиление флуоресценции наблюдается также после конъюгации красителей с олигонуклеотидами [3-А].

4. Продемонстрировано, что для всех исследованных красителей Cy5 и Cy7 наличие длинных заместителей приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в 1.2-2.0 раза, что связано с наличием фрагмента триэтиленгликоля, который препятствует агрегации гидрофобных молекул красителя. При этом положение заместителя не оказывает существенного влияния на флуоресцентные свойства Cy5, тогда как для Cy7 присоединение заместителя к полиметиновой цепи через атом серы приводит к снижению интенсивности флуоресценции в 1.1-1.6 раза. У всех исследованных красителей Cy5 и Cy7 при конъюгации с ДНК наблюдается увеличение флуоресценции, причём в случае конъюгатов с одноцепочечной ДНК этот эффект выражен сильнее, чем с двухцепочечной ДНК. При этом для красителей с длинными заместителями разница в интенсивности флуоресценции между конъюгатами и исходными красителями уменьшается, что наиболее ярко проявляется у красителя Cy7-d (Cy7 с длинным заместителем, присоединенным к полиметиновой цепи через атом серы) - разница практически отсутствует [6-А].

5. Показано, что в результате гомологичного флуоресцентно-резонансного переноса энергии (Homo-FRET) красителя Sybr Green I, интеркалированного в двухцепочечную ДНК, при увеличении концентрации красителя интенсивность флуоресценции сначала линейно возрастает до $I_{rel} \sim 0.5$, а затем происходит нелинейное возрастание и выходит на плато вследствие насыщения интеркалируемых сайтов в двухцепочечной ДНК; анизотропия флуоресценции с ростом концентрации красителя быстро снижается и выходит на остаточное постоянное значение до 8.3% [4-А; 8-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Разработанный бифлуорофор флуоресцеина $(5\text{-FAM})_2$ обладает высоким квантовым выходом и стабильностью и пригоден для флуоресцентного мечения биомолекул благодаря более высокой интенсивности флуоресценции в сравне-

нии с мономерными красителями. Установленная зависимость флуоресцентных свойств красителей Су3 и Су5 от среды поможет минимизировать ошибки при использовании их в качестве доноров и акцепторов для FRET в том числе в системах четырехцветного секвенирования ДНК. Выявленное глубокое понимание влияния свойств линкера и его положения в красителе на интенсивность флуоресценции позволяет корректно выбирать структуру реагентов для применения в биологических средах. Оценка степени влияния безызлучательного переноса энергии внутри молекул на анизотропию флуоресценции помогает изучить взаимодействие молекулярных роторов с биологическими структурами и повысить эффективность флуоресцентных сенсоров на их основе.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в научных изданиях, соответствующих требованиям ВАК Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований.

1-A. Fluorescent Properties of Carboxyfluorescein Bifluorophores / V. A. Povedailo, I. L. Lysenko, S. A. Tikhomirov, D. L. Yakovlev, D. A. Tsybulsky, A. S. Kruhlik, **F. Fan**, Y. V. Martynenko-Makaev, O. L. Sharko, P. V. Duong, P. H. Minh, V. V. Shmanai // Journal of fluorescence. – 2020. – Vol. 30. – P. 629-635.

2-A. Fluorescence of the 5-and 6-Carboxyfluorescein Bifluorophores / V. A. Povedailo, S. A. Tikhomirov, D. L. Yakovlev, I. L. Lysenko, **F. Fan**, V. V. Shmanai // Journal of Applied Spectroscopy. – 2021. – Vol. 88. – P. 33-39.

3-A. Fluorescent Properties of Cyanine Dyes As a Matter of the Environment / **F. Fan**, V. A. Povedailo, I. L. Lysenko, T. P. Seviarynchyk, O. L. Sharko, I. O. Mazunin, V. V. Shmanai // Journal of fluorescence. – 2023. – P. 1-39.

4-A. Resonance Energy Transfer Between Molecular Rotors SYBR Green Intercalated in DNA / S. A. Tikhomirov, A. P. Blokhin, V. A. Povedailo, A. S. Pilipovich, D. L. Yakovlev, **F. Fan**, V. V. Shmanai, P. H. Minh, P. V. Duong // Journal of Applied Spectroscopy. – 2021. – Vol. 88. – P. 33-39.

5-A. Photophysical Features of Protolytic Equilibria of Fluorescein Bifluorophores / **F. Fan**, V. A. Povedailo, I. L. Lysenko, O. L. Sharko, I. O. Mazunin, S. A. Tikhomirov, V. V. Shmanai // Journal of Applied Spectroscopy. – 2024. – Vol. 91. – P. 1055-1064.

6-A. Физико-химические свойства новых производных цианиновых красителей в составе конъюгатов с ДНК / **Ф. Фань**, В. А. Поведайло, А. П. Кадуцкий, Г. В. Малеев, В. В. Шманай // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2025. – Vol. 61. – №2. – P. 95-104.

Тезисы докладов

7-А. Структурные конфигурации и флуоресцентные свойства бифлуорофоров 5-и 6-карбоксивфлуоресцеинов / В. А. Поведайло, И. Л. Лысенко, **Фань Фань**, С. А. Тихомиров, Д. Л. Яковлев, А. Д. Широканов, В. В. Шманай // XIII Международная научно-техническая конференция «Квантовая электроника». Минск – 2021. – P. 122-125.

8-А. Electronic energy transfer between a cyanine-based molecular rotors SYBR Green intercalated in DNA / S. A. Tikhomirov, A.P. Blokhin, V. A. Povedailo, D. L. Yakovlev, **Fan Fan**, V. V. Shmanai, Pham Hong Minh, Pham Van Duong // The 12th international conference on photonics and applications (ICPA-12). Vung Tau, Vietnam – 2022. – P. 128.

РЕЗЮМЕ

Фань Фань

Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов

Ключевые слова: флуоресцеиновые красители, цианиновые красители, интеркалированные красители, «клик»-реакция, флуоресценция, квантовый выход, FRET, биоконъюгация, олигонуклеотиды, белки.

Цель работы: Диссертация посвящена изучению флуоресцентных, структурных и оптических свойств ксантеновых и цианиновых красителей, применяемых для мечения биомолекул, а также их свойств в составе биоконъюгатов. Целью работы является разработка функциональных производных флуоресцентных красителей на основе известных флуорофоров для мечения белков и олигонуклеотидов и установление их физико-химических свойств в различных условиях.

Объектом исследования являются флуоресцентные красители ксантенового и цианинового рядов, а также их конъюгаты с белками и синтетическими ДНК-олигонуклеотидами. **Предметом исследования** являются физико-химические характеристики флуоресцентных красителей указанных классов, а также их конъюгатов с биомолекулами.

Методы исследования: спектрофотометрия УФ-видимой области спектра, флуориметрия, гель-проникающая хроматография, ЯМР, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия, современные методы органического синтеза.

Полученные результаты и их новизна: получение бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂, содержащих две молекулы карбоксифлуоресцеина, на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, и изучены физико-химические свойства в сравнении с монофлуорофором флуоресцеина. Исследованы флуоресцентные свойства конъюгатов бифлуорофоров с белками. Исследованы причины низких квантовых выходов флуоресценции цианиновых красителей Cy3 и Cy5 с точки зрения растворимости и конформационной перестройки красителей в возбужденном состоянии. Установлено, что интенсивность флуоресценции этого типа красителей резко возрастает при конъюгации с одноцепочечной ДНК. Синтезированы красители Cy5 и Cy7, содержащие линкеры разной длины в разных положениях и проведено сравнительное исследование флуоресценции этих красителей и их ДНК-конъюгатов. Изучены гомологичный резонансный перенос энергии (Homo-FRET) красителя Sybr Green I, интеркалируемого в ДНК.

Область применения: биоорганическая химия, биоконъюгация белков и нуклеиновых кислот, фотохимия и фотофизика.

SUMMARY

Fan Fan

Synthesis and physicochemical properties of fluorescent bioconjugates

Keywords: fluorescein dyes, cyanine dyes, intercalated dyes, click-reaction, fluorescence, quantum yield, FRET, bioconjugation, oligonucleotides, proteins.

The purpose of the work: The dissertation is devoted to the research of fluorescent, structural and optical properties of xanthene and cyanine dyes used for labeling of biomolecules, as well as their properties in the composition of bioconjugates. The purpose of this work is to develop functional derivatives of fluorescent dyes based on known fluorophores for labeling proteins and oligonucleotides and to establish their physicochemical properties under different conditions.

The object of the research is fluorescent dyes of xanthene and cyanine series, as well as their conjugates with proteins and synthetic DNA-oligonucleotides. The subject of the research is the physicochemical characteristics of fluorescent dyes of the mentioned classes, as well as their conjugates with biomolecules.

Research methods: UV-visible spectrophotometry, fluorimetry, gel permeation chromatography, NMR, HPLC, chromatography-mass spectrometry, modern methods of organic synthesis.

Obtained results and their novelty: obtained bifluorophores (5-FAM)₂ and (6-FAM)₂ containing two carboxyfluorescein molecules on the basis of 3,5-diaminobenzoic acid and researched physical chemical properties in comparison with fluorescein monofluorophores. Fluorescence properties of conjugates of bifluorophores with proteins were investigated. The reasons for the low fluorescence quantum yields of Cy3 and Cy5 cyanine dyes were investigated in terms of solubility and conformational rearrangement of the dyes in the excited state. The fluorescence intensity of this type of dyes was found to increase dramatically upon conjugation with single-stranded DNA. Cy5 and Cy7 dyes containing linkers of different lengths in different positions were synthesized and the fluorescence of these dyes and their DNA conjugates was comparatively investigated. Homologous resonance energy transfer (Homo-FRET) of Sybr Green I dye intercalated into DNA was investigated.

Field of application: bioorganic chemistry, bioconjugation of proteins and nucleic acids, photochemistry and photophysics.

РЭЗІЮМЭ

Фань Фань

Сінтэз і фізіка-хімічныя ўласцівасці флуарэсцэнтных біякан'югатаў

Ключавыя словы: флуарэсцынавыя фарбавальнікі, цыянінавыя фарбавальнікі, інтэркаліраваныя фарбавальнікі, «клік»-рэакцыя, флуарэсцэнцыя, квантавы выхад, FRET, біякан'югацыя, алігануклеатыды, бялкі.

Мэта працы: Дысертацыя прысвечана вывучэнню флуарэсцэнтных, структурных і аптычных уласцівасцей ксантэнавых і цыянінавых фарбавальнікаў, якія прымяняюцца для пазначання біямалекул, а таксама іх уласцівасцей у складзе біякан'югатаў. Мэтай працы з'яўляецца распрацоўка функцыянальных вытворных флуарэсцэнтных фарбавальнікаў на аснове вядомых флуарафораў для пазначання бялкоў і алігануклеатаў і ўсталяванне іх фізіка-хімічных уласцівасцей у розных умовах.

Аб'ектам даследавання з'яўляюцца флуарэсцэнтныя фарбавальнікі ксантэнавага і цыянінавага шэрагаў, а таксама іх кан'югаты з бялкамі і сінтэтычнымі ДНК-алігануклеатаўмі. Прадметам даследавання з'яўляюцца фізіка-хімічныя характарыстыкі флуарэсцэнтных фарбавальнікаў названых класаў, а таксама іх кан'югатаў з біямалекуламі.

Метады даследавання: спектрафатометрыя УФ-бачнай вобласці спектру, флуарыметрыя, гель-пранікальная храматаграфія, ЯМР, ВЭВХ, храмата-мас-спектраметрыя, сучасныя метады арганічнага сінтэзу.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: атрыманы новыя біфлуарафоры (5-FAM)₂ і (6-FAM)₂, якія змяшчаюць дзве малекулы карбоксифлуарэсцыну, на аснове 3,5-дыамінабэнзойнай кіслаты, і вывучаны фізіка-хімічныя ўласцівасці ў параўнанні з монафлуарафорам флуарэсцыну. Даследаваны флуарэсцэнтныя ўласцівасці кан'югатаў біфлуарафораў з бялкамі. Даследаваны прычыны нізкіх квантавых выхадаў флуарэсцэнцыі цыянінавых фарбавальнікаў Су3 і Су5 з пункту гледжання іх растваральнасці і канфармацыйнай перабудовы ва ўзбуджаным стане. Устаноўлена, што інтэнсіўнасць флуарэсцэнцыі гэтага тыпу фарбавальнікаў рэзка ўзрастае пры кан'югацыі з адналанцуговай ДНК. Сінтэзаваны фарбавальнікі Су5 і Су7, якія змяшчаюць лінкеры рознай даўжыні ў розных палажэннях і праведзена параўнальнае даследаванне флуарэсцэнцыі гэтых фарбавальнікаў і іх ДНК-кан'югатаў. Вывучаны гамалагічны рэзанансны перанос энергіі (Homo-FRET) фарбавальніка Sybr Green I, інтэркаліруемага ў ДНК.

Вобласць прымянення: біяарганічная хімія, біякан'югацыя бялкоў і нуклеінавых кіслот, фотахімія і фотафізіка.