

Білки та ціанінові барвники. 2. Застосування реакції пірилієвих барвників з амінами для ковалентного мічення амінокислот і пептидів

О. М. Костенко, С. Ю. Дмитрієва, С. М. Ярмолюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Запропоновано новий амінореактивний пірилієвий барвник для кон'югації з вільними аміногрупами білків. Досліджено реакційну здатність 11 амінокислот з різними бічними функціональними групами у триетиламонійацетатному і карбонат-бікарбонатному буферах. Здійснено кон'югацію з модельним пептидом.

Вступ. Флюоресцентні зонди, що реагують з аміногрупами, широко застосовуються для модифікації білків, пептидів, синтетичних олігонуклеотидів та інших біомолекул. Як правило, «активні барвники» містять хімічно реактивні ацилюючі групи, які утворюють амідні, сульфамідні, сечовинні або тіосечовинні після реакції з аміногрупою [1].

Раніше нами був запропонований принципово новий хімічний підхід для флюоресцентного 5'-мічення олігонуклеотидів [5]. Для цього було використано реакцію пірилієвого ціанінового барвника 2-(2,6-диметил-4Н-4-піраніліденметил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум перхлорату (Суап 39, I) з аміногрупою аміноалкіл-модифікованого олігонуклеотиду. Ковалентна кон'югація барвника-зонда супроводжувалася перетворенням слабофлюоресцентного вихідного пірилієвого ціаніну у флюоресцентний піридинієвий барвник 2-(2,6-диметил-1-алкіл-1,4-дигідро-4-піридиніліденметил)-3-метил-1,3-бензотіазол-3-іум (Суап 40, II) (схема).

У даній роботі зроблено першу спробу використання зазначеної реакції для ковалентного мічення амінокислот та пептидів ціаніновими барвниками.

Матеріали і методи. В роботі використовували Na_2CO_3 та NaHCO_3 («Реакхим», Росія), ϵ -аміно-

капронову кислоту (Асп), L-лізин, L-цистеїн, L-серин, L-триптофан, L-аланін, L-валін, L-аргінін, L-аспаргін, L-гістидин («Реанал», Угорщина).

Диметилсульфоксид (ДМСО) та етиловий спирт використані без попереднього очищення. Триетиламоній та оцтова кислота («Реакхим») були перегнані один раз при атмосферному тиску. Спектрофотометричні дослідження здійснювали на приладі «Spectord M-40» (Німеччина). Хроматомаспектрометр HP GC/MS 5890/5972 з колонкою HP 5MS (внутрішній діаметр 0,25 мм, довжина 30 м) використано для аналізу реакційних сумішей після проведення реакції з амінокислотами.

Na_2CO_3 - NaHCO_3 буфер з інтервалом pH 9,2—10,8 готували згідно з [2]; 0,1 М триетиламонійацетатний (TEAA) буфер (pH 11,3—11,6) — розведенням його 1 М розчину та додаванням триетиламонію до потрібної величини pH.

Як модельний поліпептид використовували C-кінцевий фрагмент кінрази S6 рибосомного білка людини (p70-S6 кінназа) довжиною 72 амінокислотних залишки.

Загальна процедура проведення реакції з амінокислотами. 0,5 мл 0,01 М розчину амінокислоти змішували з 0,5 мл 0,1 М буфера та додавали 0,5 мл 0,01 М розчину Суап 39 у ДМСО. Далі реакційну суміш термостатували при температурі 50 °С. Через певні проміжки часу (10—20 хв) відбирали проби реакційної суміші (0,02 мл), спи-

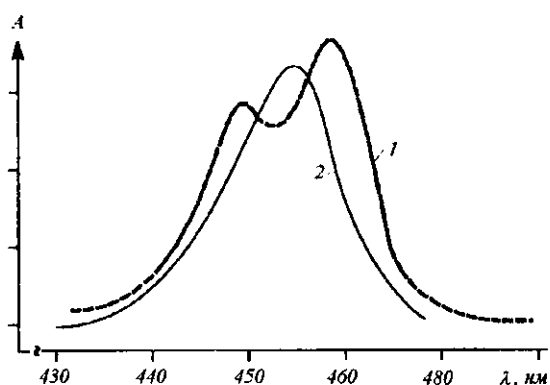
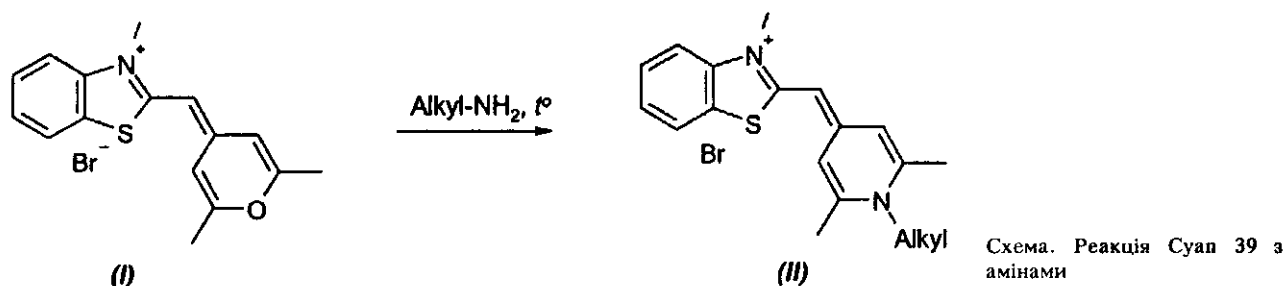


Рис. 1. Електронні спектри поглинання барвників Суап 39 (1) та Суап 40 (2)

ртом доводили об'єм до 2 мл і записували спектри абсорбції. Реакцію вважали завершеною при зміні кривої спектра поглинання 1 на 2 (рис. 1).

Попередньо проведені експерименти з сумішами Суап 39—Суап 40 з різним процентним співвідношенням барвників дають підставу стверджувати про досить високу чутливість цього підходу. Так, 5 % домішки Суап 39 ($\lambda_{\max} = 460$ нм) у Суап 40 ($\lambda_{\max} = 434$ нм) були добре помітні на спектрі поглинання (даних не наведено).

Загальна процедура хроматомаспектроскопічного аналізу реакційної суміші. Реакційну суміш (1 мл) екстрагували хлористим метиленом (1 мл) і 5 мкл метиленового розчину вводили в колонку. Температура інжектора складала 280 °С, детектора — 300 °С. Температурний режим хроматографування: 120 °С — 2 хв, потім градієнт температури

до 300 °С із швидкістю 20 °С/хв та 15 хв при 300 °С.

Загальна процедура мічення пептиду. До розчину $3,5 \cdot 10^{-7}$ моль пептиду в 50 мкл води додавали 50 мкл відповідного 0,1 М буфера (триетиламоній-ацетатного з рН 11,65 або карбонат-бікарбонатного з рН 10,8) та 100 мкл $2,5 \cdot 10^{-6}$ М розчину Суап 39. Реакційну суміш витримували протягом 90 хв на водяній бані з температурою 50 °С, після чого її аналізували електрофорезом у поліакриламідному гелі.

Результати і обговорення. Реакція пірилієвих ціанінових барвників з первинними амінами є одним з добре відомих методів отримання піридинієвих ціанінових барвників (схема). Так, наприклад, для синтезу барвника Суап 40 (II) вихідний ціанін Суап 39 (I) кип'ять протягом 2 год у 25 %-му спиртовому розчині метиламіну [3]. Подібні реакції описані також у киплячому ДМФА [4].

Зрозуміло, що за таких умов взаємодії з амінами ця реакція не може застосовуватися для мічення біологічних об'єктів.

Раніше нами були відпрацьовані м'які умови для мічення олігонуклеотидів за допомогою зазначеної реакції. Так, у досить лужному середовищі Суап 39 добре реагував з первинною аміногрупою на довгому аліфатичному ланцюзі аміноалкілмодифікованого олігонуклеотиду [5]. Поширення цього методу для амінокислот та пептидів вимагає більш детального вивчення взаємодії ціанінового барвника з амінокислотами.

Метою нашої роботи було дослідження швидкості реакції Суап 39 з аміногрупами різних амінокислот у залежності від природи аміногрупи (стеричні утруднення, pK_a) та впливу бічних функціональних груп амінокислот на перебіг реакції (побічні реакції, каталіз), а також розробка умов мічення білка. Реакцію досліджували при темпера-

Таблиця 1
Час реакції Суап 39 з амінокислотами в карбонат-бікарбонатному буфері

pH	Час реакції, хв										
	Asp	Lys	Ser	Cys	Arg	Gly	Ala	Val	Trp	His	Asp
9,2	115	42	240	80	120	150	—*	—	—	—	—
9,8	20	35	95	65	100	30	—	—	> 240	> 240	> 240
10,1	11	30	60	50	95	26	180	240	180	135	160
10,5	7	10	40	10	45	22	50	105	80	75	60
10,8	5	7	32	10	35	12	45	90	75	65	40

*Реакція практично не йде.

Таблиця 2
Час реакції Суап 39 з амінокислотами в ТЕАА

pH	Час реакції, хв										
	Asp	Lys	Ser	Cys	Arg	Gly	Ala	Val	Trp	His	Asp
11,3	40	40	> 150	150	—*	25	—	—	—	—	> 150
11,45	35	37	150	100	—	15	—	—	—	—	145
11,6	20	20	80	60	95	9	85	95	100	95	110

*Реакція практично не йде.

турі 50 °С та інтервалі рН 9,2—11,6. Більшість білків за таких умов не руйнується. Необхідна лужність середовища повинна забезпечуватися буфером, який не містить первинних та вторинних аміногруп, оскільки останні реагують з барвником. Триетиламоніацетатний та карбонат-бікарбонатний буфери задовольняють цим вимогам і забезпечують необхідний для реакції інтервал рН.

Основні результати стосовно швидкості перебігу реакції подані в табл. 1, 2.

Як природа амінокислоти впливає на швидкість реакції, видно з табл. 1, 2. Так, найшвидше реагує аміногрупа біля вторинного атома вуглецю (Asp, Gly). Алкільні та алкіларильні замісники в α -положенні амінокислоти значно знижують швидкість реакції, причому ізопропільний (Val) значно сильніше деактивує аміногрупу, ніж метильний (Ala), завдяки стеричним утрудненням. Амінокислоти, які містять у бічному ланцюзі функціональні групи, реагують набагато швидше. Можливо, це можна пояснити певним внутрішньомолекулярним

каталізом. Так, гідроксильна та тіольна групи не реагують з барвником, але значно підвищують швидкість реакції (Ser та Cys відповідно). Імідазольне кільце (His) незначним чином прискорює реакцію.

Особливо яскраво вплив природи амінокислоти виявляється в карбонат-бікарбонатному буфері. В ТЕАА буфері при високому значенні рН різниця швидкості реакції для різних амінокислот не така значна. В цілому можна відмітити певну селективність реакції в карбонат-бікарбонатному буфері та більш рівномірну швидкість реакції для амінокислот в ТЕАА буфері.

Крім вивчення швидкості взаємодії амінокислот з Суап 39, необхідно також пересвідчитися у відсутності реакцій з наявними функціональними групами, відмінними від аміногрупи. Так, реакційну здатність до пірилевого циклу потенційно можуть мати гуанідинова група аргініну та карбоксамідна група (Asp та Gln).

Woc-Arg використано для дослідження реакцій-

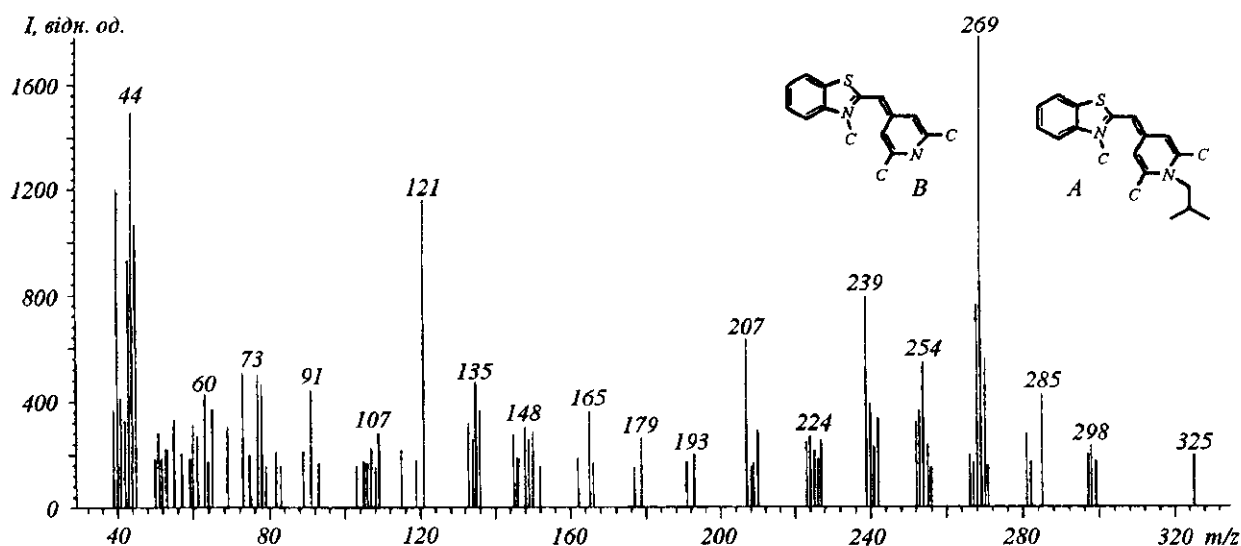


Рис. 2. Мас-спектр продукту реакції Суап 39 з валіном

ної здатності гуанідинової групи. Проводили реакцію в стандартних умовах при рН 11,4 для ТЕАА та рН 10,8 для карбонат-бікарбонатного буферів. В останньому випадку спектральний перехід Суап 39 і Суап 40 повністю відбувається за 17 хв, тобто гуанідинова група досить швидко реагує з барвником. В ТЕАА буфері, навпаки, реакція практично не йде. Так, зміна спектра адсорбції була ледве помітна через 60 хв, а через 210 хв він мав вигляд, характерний для початку реакції.

Вос-Asp не реагував у жодному з буферів в зазначеному інтервалі рН з Суап 39.

2 моля Суап 39 з 1 молем незахищеного Lys повністю вступають у реакцію, тобто вільний Lys модифікується по двох аміногрупах. Реакція з α -Wos-Lys проходить зі швидкістю, характерною для аміногрупи на довгому аліфатичному ланцюзі (15–20 хв).

Структуру утворених амінокислотних похідних було підтверджено за допомогою хроматомаспектроскопії. Молекулярні піки спостерігалися для Asp (382), Ala (340), Ser (357) та Gly (327). Для інших похідних відмічено молекулярні піки продуктів термічної деструкції через досить жорсткі умови хроматографування. Так, наприклад, у випадку Val (молекулярна маса кон'югату 369), мас-спектр якого наведено на рис. 2, максимальний пік відповідає декарбоксілованому продукту А (325) (рис. 2).

На всіх спектрах також присутній досить інтенсивний пік з m/z 269, котрий може відповідати продукту термічного розпаду В (269).

Для перевірки можливості мічення пептидів за допомогою дослідженої реакції здійснено кон'югацію Суап 39 з модельним пептидом довжиною 72 амінокислотних залишки, з яких шість залишків були Lys та Arg, в обох досліджених буферах. Молярне співвідношення барвник:пептид було обрано 7:1, щоб прив'язати барвник до всіх вільних аміногруп пептиду. ПААГ-електрофорез показав гомогенність отриманих забарвлених кон'югатів в обох буферах, що свідчить про можливість застосування даного методу для мічення пептидів.

На відміну від відомих амінореактивних барвників, які або потребують попередньої активації для проведення кон'югації, або доступні вже в активному, але нестійкому стані, Суап 39 є абсолютно стійким та не потребує ніякої активації для зазначеної кон'югації. Мічення пептиду даним методом може відбуватися лише по вільних аміногрупах (ϵ -аміногрупи лізину та N-кінцева) або ж додатково ще й по гуанідинових групах аргініну в залежності від природи обраного реакційного середовища. Регулювати ступінь кон'югації можна, змінюючи лужність реакційного середовища.

На наш погляд, запропонований метод є зручним та перспективним шляхом мічення пептидів і білків.

Автори висловлюють щирю подяку С. Лукашову за надання барвника Суап 39 та О. Кухаренку — за створення модельного пептиду.

O. M. Kostenko, S. U. Dmitrieva, S. M. Yarmoluk

Peptides and cyanine dyes. 2. Covalent labelling of amino acids and peptides by means of the reaction of pyrylium cyanine dyes with amines

Summary

Here we propose a new amino-reactive pyrylium dye for the conjugation with peptides through N-terminal and N-ε-lysine's aminogroups. The reactivity of Cyan 39 towards eleven most interesting aminoacids has been investigated in triethylammonium acetate and sodium carbonate-bicarbonate buffers. The conjugation with 72-aminoacid model peptide has been carried out successfully.

A. H. Kostenko, S. Ю. Дмитриева, С. М. Ярмолук

Белки и цианиновые красители. 2. Использование реакции пирилевых красителей с аминами для ковалентного мечения аминокислот и пептидов

Резюме

Предложен новый аминокреактивный пирилевым краситель для конъюгации с пептидами по N-концевой группе и N-ε-амино-

группе лизина. Исследована реакционная способность 11 наиболее интересных аминокислот в триэтиламмонийацетатном и карбонат-бикарбонатном буферах. Проведена конъюгация с модельным пептидом.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Naughland R. P.* Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals // Molecular Probes.—Eugene: OR, 1996.—679 p.
2. *Донсон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика.—М.: Мир, 1991.—367 с.
3. *Kelemen J., Wizinger R.* Über alkylsubstituierte Pyrylo- und Pyridino-cyanine. I. 2,6-Dimethylpyrylo- und 2,6-Dimethylpyridino-cyanine aus 2,6-Dimethyl-γ-pyron // *Helv. Chim. acta.*—1962.—45.—P. 1908—1917.
4. *Ярмолук С. М., Криворотенко Д. В., Герасимчук Ю. С.* Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 6. Синтез та спектроскопічні властивості кон'югатів тіазолового оранжевого з амінокислотами // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 3.—С. 247—251.
5. *Yarmoluk S. M., Kostenko A. M., Kornushyna O. S., Dubey I. Y.* Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 4. Efficient 5'-fluorescent labelling of oligonucleotides with monomethyne pyrylium cyanine dye, Cyan 39 // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 1.—P. 82—86.

УДК 542.95

Надійшла до редакції 29.06.99