РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 455 356** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 15/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011114684/10, 13.04.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.04.2011

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **13.04.2011**

(45) Опубликовано: **10.07.2012** Бюл. № **19**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2241710 C1, 10.12.2004. RU 2236409 C1, 20.09.2004. BEGUNOV R.S. et al. "Reductive cyclization of N-(2,4-dinitrophenyl)pyridinium chloride by tin(II) chloride" Chemistry of Heterocyclic Compounds, vol.40, no 9, 2004, p.1224, 1225. BEGUNOV R.S. et al. "Simple Synthesis of Substituted Benzo[4,5]imidazo[1.2-α]pyridines" Russian Journal of Organic Chemistry, vol.40, no 11, 2004, p.1694-1696.**

Адрес для переписки:
150000, г.Ярославль, ул. Советская, 14, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Управление научных исследований и инноваций

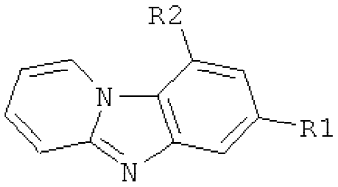
(72) Автор(ы):
Бегунов Роман Сергеевич (RU),
Рызванович Галина Александровна (RU),
Соколов Александр Андреевич (RU),
Рачинская Ольга Анатольевна (RU),
Муравенко Ольга Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова" (RU)

(54) ДНК-ИНТЕРКАЛЯТОРЫ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕНОМОВ МЕЛКОХРОМОСОМНЫХ РАСТЕНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Описано применение биологически активных соединений, обладающих вставочной активностью, в качестве ДНК-интеркаляторов для исследования геномов растений с мелкими размерами хромосом. Производные пиридо[1,2-a]бензимидазола формулы:



где R1=CF_3, R2=H (I); R1=NH_2, R2=H (II); R1=CF_3, R2=NH_2 (III), удлиняют размер хромосом в клетках корневой меристемы растений с малыми размерами хромосом при обработке водно-спиртовыми растворами с концентрацией 0.5-0.8 мкг/мл за 12 ч до фиксации в течение 6 ч. Изобретение предоставляет ДНК-интеркаляторы для картирования геномов мелкохромосомных объектов, обладающие повышенной вставочной активностью, которые используются в меньших концентрациях, чем существующие аналоги. 1 табл.

RU 2455356 C1

RU 2455356 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 455 356** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011114684/10, 13.04.2011**

(24) Effective date for property rights:
13.04.2011

Priority:
(22) Date of filing: **13.04.2011**

(45) Date of publication: **10.07.2012 Bull. 19**

Mail address:
150000, g.Jaroslavl', ul. Sovetskaja, 14, Jaroslavskij gosudarstvennyj universitet im. P.G. Demidova, Upravlenie nauchnykh issledovanij i innovatsij

(72) Inventor(s):
Begunov Roman Sergeevich (RU),
Ryzvanovich Galina Aleksandrovna (RU),
Sokolov Aleksandr Andreevich (RU),
Rachinskaja Ol'ga Anatol'evna (RU),
Muravenko Ol'ga Viktorovna (RU)

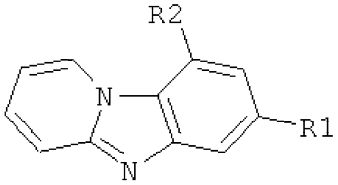
(73) Proprietor(s):
Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovanija "Jaroslavskij gosudarstvennyj universitet im. P.G. Demidova" (RU)

(54) DNA INTERCALATORS FOR CYTOGENETIC STUDIES OF GENOMES OF PLANTS WITH SMALL CHROMOSOMES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is described is the use of biologically active compounds showing intercalated activity as DNA-intercalators for the studies of genomes of plants with small chromosomes. The pyrido[1,2-a]benzimidazole derivatives of formula:



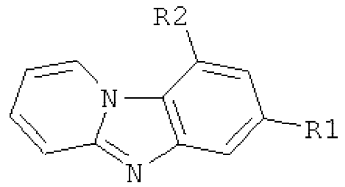
wherein R1=CF_3, R2=H (I); R1=NH_2, R2=H (II); R1=CF_3, R2=NH_2 (III), lengthen the chromosomes in the root meristem cells of the plants with small chromosomes when processed in aqueous-alcoholic solutions of the concentration of 0.5-0.8 mcg/ml 12 h prior to fixation for 6 h.

EFFECT: invention presents DNA-intercalators for the purpose of genome mapping of the objects with small chromosomes, showing higher intercalated activity and used in the smaller concentration than the existing analogues.

RU 2455356 C1

RU 2455356 C1

Изобретение относится к области использования биологически активных соединений, обладающих вставочной активностью, в качестве ДНК-интеркаляторов для исследования геномов растений с мелкими размерами хромосом. В качестве таковых предлагаются поликонденсированные азагетероциклы общей формулы:



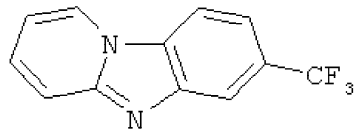
где R1=CF_3, R2=H; R1=NH_2, R2=H; R1=CF_3, R2=NH_2.

Известны следующие ДНК-интеркаляторы: этидий бромистый [Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Antonian A.P., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1996. V. 14, N 2. P. 275-283], акридиновый оранжевый [Zelenin A.V. Fluorescent and luminescent probes for biological activity. London: Acad. Press. 1999. P. 117-135], которые вызывают недоконденсацию хроматина в концентрации 4 мкг/мл, и 9-аминоакридин гидрохлорид [Muravenko O.V., Amosova A.V., Samatadze T.E., Popov K.V., Poletaev A.I., Zelenin A.V. // Cytometry. 2003. Vol.51. P.52-57; Муравенко О.В., Саматадзе Т.Е., Попов К.В., Амосова А.В., Зеленин А.В. // Генетика. 2001. Т. 37. №3. С.332-335], применяемый в концентрации 1 мкг/мл. К недостаткам данных веществ относятся - высокая концентрация, применяемая для обработки объектов исследования (клеточные культуры, органы и организмы), и, как следствие, сильные цитостатическое и мутагенное действия.

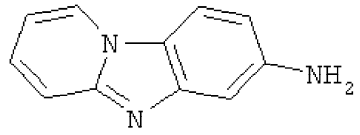
Целью изобретения является подбор новых ДНК-интеркаляторов для картирования геномов мелкохромосомных объектов, обладающих повышенной вставочной активностью, которые используются в меньших концентрациях, чем существующие аналоги.

Поставленная цель достигается тем, что вместо традиционно используемого 9-аминоакридин гидрохлорида предлагается использовать следующие соединения:

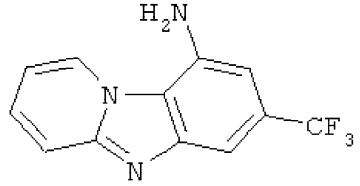
7-трифторметил-пиридо[1,2-а]бензимидазол (I)



7-аминопиридо[1,2-а]бензимидазол (II)



7-трифторметил-9-аминопиридо[1,2-а]бензимидазол (III)



,

в концентрациях 0.8 мкг/мл для I, до 0.6 мкг/мл для II, до 0.5 мкг/мл для соединения III для предобработки корневой меристемы семян мелкохромосомных растений. Способность соединений I-III встраиваться в двойную спираль ДНК оценивали по степени недоконденсации метафазных хромосом в меристеме, такого

классического объекта с хромосомами мелкого размера, как Linum grandiflorum Desf., при обработке растворами соединений I-III за 12 ч до фиксации клеток в течение 6 ч. Для этого измеряли длину метафазных хромосом третьей пары из генома Linum grandiflorum Desf. в опыте, сравнивали ее со значением в норме, без ДНК-интеркалятора, и при действии известного интеркалятора - 9-аминоакридин гидрохлорида. Однозначное определение хромосом пары 3 в геноме проводили детекцией нуклеотидных последовательностей двух генов, локализованных только в данной хромосоме, с использованием метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. 7-(трифторметил)-пиридо[1,2-a]бензимидазол (I)

Корешки пророщенных семян L. grandiflorum Desf. за 12 ч до фиксации помещали в водно-спиртовой раствор I с концентрацией 1 мкг/мл на 6 ч. Затем корешки фиксировали и готовили клеточные препараты корневой меристемы по стандартной методике [Муравенко О.В., Зеленин А.В. // Генетика. 2009. Т.45. №11. С.1457-1471]. Идентификацию хромосомы пары 3 проводили флуоресцентной гибридизацией in situ (FISH) нуклеотидных последовательностей 26S и 5S рРНК-х генов, которые локализованы именно в этой паре хромосом. В качестве проб для FISH использовали последовательности генов 26S и 5S рРНК из генома Linum austriacum. Сайты гибридизации распознавали путем иммунодетекции. Фрагменты 26S рДНК метили биотином, фрагменты 5S рДНК - дигоксигенином. Выявление биотин-меченых проб 26S рДНК проводили с помощью стрептавидин-флуоресцеина. Для проб 5S рДНК, меченных дигоксигенином, использовали антидигоксигенин-родамин.

Изображения метафазных хромосом с клеточных препаратов регистрировали с помощью 12-битной (4095 уровней серого) черно-белой ПЗС камеры, установленной на микроскоп.

Предобработка клеток соединением I в концентрации 1 мкг/мл приводила к увеличению средней длины хромосом пары 3 L. grandiflorum Desf. до 4.67±1.07 мкм, тогда как без интеркалятора длина метафазных хромосом третьей пары 2.52±0.33 мкм.

Пример 2. 7-аминопиридо[1,2-a]бензимидазол (II)

Исследование проводили аналогично I.

Предобработка пророщенных корешков L. grandiflorum Desf. за 12 ч до фиксации водно-спиртовым раствором II с концентрацией 1 мкг/мл в течение 6 ч приводит к увеличению средней длины хромосом пары 3 до 6.27±1.18 мкм, тогда как без интеркалятора длина метафазных хромосом третьей пары 2.52±0.33 мкм.

Пример 3. 7-трифторметил-9-аминопиридо[1,2-a]бензимидазол (III)

Исследование проводили аналогично I.

Предобработка пророщенных корешков L. grandiflorum Desf. за 12 ч до фиксации водно-спиртовым раствором III с концентрацией 1 мкг/мл в течение 6 ч приводит к увеличению средней длины хромосом пары 3 до 7.12±1.49 мкм, тогда как без интеркалятора длина метафазных хромосом третьей пары 2.52±0.33 мкм.

Пример 4. 9-аминоакридин гидрохлорид (Sigma-Aldrich, USA CAS [52417-22-8])

Предобработка корневой меристемы L. grandiflorum Desf. водно-спиртовьм раствором 9-аминоакридин гидрохлорида в концентрации 1 мкг/мл приводит к увеличению средней длины хромосом пары 3 до 3.76±0.63 мкм, тогда как без интеркалятора длина метафазных хромосом третьей пары 2.52±0.33 мкм. Полные результаты представлены в таблице 1.

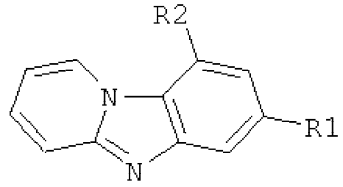
Таблица 1

Влияние обработки интеркаляторами на длину маркированной флуоресцентными метками хромосомы 3 Linum grandiflorum Desf.					
ДНК-интеркалятор	Выбранный интервал				
	N	W_{max}	W_{min}	X, мкм	SD, мкм
7-трифторметил-пиридо[1,2-а]бензимидазол	35	6.66	3.08	4.67	1.07
7-аминопиридо[1,2-а]бензимидазол	24	8.45	4.59	6.27	1.18
7-трифторметил-9-амино-пиридо[1,2-а]бензимидазол	25	11.34	5.33	7.12	1.49
9-аминоакридин	22	4.89	3.01	3.76	0.63
Контроль	35	3.33	1.74	2.52	0.33
N - число хромосом в выборке, W_{max} - максимальная длина хромосомы, W_{min} - минимальная длина хромосомы, X - среднее значение длины, SD - стандартное отклонение					

Таким образом, соединения I-III обладают способностью значительно сильнее удлинять метафазные хромосомы, чем 9-аминоакридин гидрохлорид, в той же концентрации 1 мкг/мл. Это позволит при использовании соединений I-III в качестве ДНК-интеркаляторов снизить действующую концентрацию до 0.8 мкг/мл для I, до 0.6 мкг/мл для II, до 0.5 мкг/мл для соединения III и тем самым уменьшить цитостатическое и токсическое действие, оказываемое ДНК-интеркалятором на объект исследования.

Формула изобретения

Применение азогетероциклов общей формулы



где R1=CF_3, R2=H; R1=NH_2, R2=H; R1=CF_3, R2=NH_2, в качестве ДНК-интеркаляторов для увеличения размеров хромосом в клетках корневой меристемы растений с мелкими размерами хромосом при обработке водно-спиртовыми растворами с концентрацией 0,5-0,8 мкг/мл за 12 ч до фиксации в течение 6 ч, что необходимо для картирования геномов мелкохромосомных объектов.