

Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms



Zelinskiy S.N.^{*}, Danilovtseva E.N., Glyzina O.Yu., Sukhanova L.V., Strelova M.S., Pal'shin V.A., **Annenkov V.V.**

Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Ulan-Batorskaya Str., Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Vital dyes capable of staining developing skeletal elements made of carbonate or calcium phosphate contain carboxyl groups that can interact with calcium ions. These dyes are in demand both in research of the biomineralization mechanisms and in the tagging of fish and mollusks in ecological and aquaculture experiments. At the same time, negatively charged dye molecules such as calcein do not penetrate cell membranes well. This necessitates the use of high concentrations, which can cause toxic effects and non-specific staining. This article describes an effective method for synthesizing a new fluorescent dye, QE2, containing a weakly basic amino group and two carboxyl groups in the form of methyl esters capable of hydrolysis in a weakly alkaline environment or under the action of enzymes. The fluorescence of QE2 and its hydrolysis product significantly depends on the polarity of the environment, intensifying in a nonpolar environment with a simultaneous shift in emission from the green-blue to the blue region. The dye is able to easily penetrate living cells, as shown by the example of dinoflagellate culture. Growing organisms with calcium skeletons (gastropods, fish) in the presence of QE2 leads to fluorescent staining of growth areas (gastropod shell aperture, fish spine and fin elements). The QE2 dye can be used to track areas of calcium mineralization, assess the polarity of cell organelles, introduce markers into fish for experiments in ecology and aquaculture, and stain cell cultures and skeletal elements for confocal microscopy studies.

Keywords: fluorescence, vital dye, coumarin, calcium skeletons, dinoflagellates, gastropods, whitefish

For citation: Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Glyzina O.Yu., Sukhanova L.V., Strelova M.S., Pal'shin V.A., Annenkov V.V. Weakly basic fluorescent dye for vital staining of calcium structures in living organisms // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - P. 1289-1304. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289

1. Introduction

The vital staining of skeletal elements of living organisms with fluorescent dyes is used to monitor growth, study the influence of various factors on organisms, and investigate the mechanisms of biomineral structure formation. In the case of organisms with a siliceous skeleton (diatoms, sponges), compounds containing substituents with electron-donating nitrogen atoms at the fluorophore are used. These dyes easily penetrate biomineralizing cells and bind to growing siliceous structures, allowing to trace the growth of these structures (Annenkov et al., 2010; Kucki and Fuhrmann-Lieker, 2012; Shimizu et al., 2001). Calcein, alizarin, and tetracycline (Fig. 1) are used for staining skeletal elements based on calcium carbonate or phosphate (González-Pabón et al., 2021; Mount et al., 2004;

Prentice et al., 2006; Vidavsky et al., 2015). Such compounds are in demand in environmental research and aquaculture, where they are used to introduce fluorescent markers into the shells of mollusks and the fins of fish. This allows the subsequent tracking of specimens in their natural environment. The dyes are introduced with food or into aquarium water in fairly high concentrations (20-500 μM) (Davis and Honeyfield, 2020; Gao et al., 2024; Prentice et al., 2006; Ramesh et al., 2017), significantly exceeding the concentration of dyes in experiments with siliceous organisms (0.5-1 μM). Previously (Zelinskiy et al., 2023), we reported on the synthesis of the coumarin dye QA2 (Fig. 1), which effectively stains synthetic calcium carbonate and calcium phosphate. Attempts to use QA2 at a concentration of 1 μM for in vivo staining of the shells of Baikal gastropods *Benedictia baicalensis* were unsuccessful.

*Corresponding author. E-mail address: jt1233@mail.ru (S. Zelinskiy)

Received: November 02, 2025;

Accepted after revised: December 01, 2025;

Available online: December 25, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



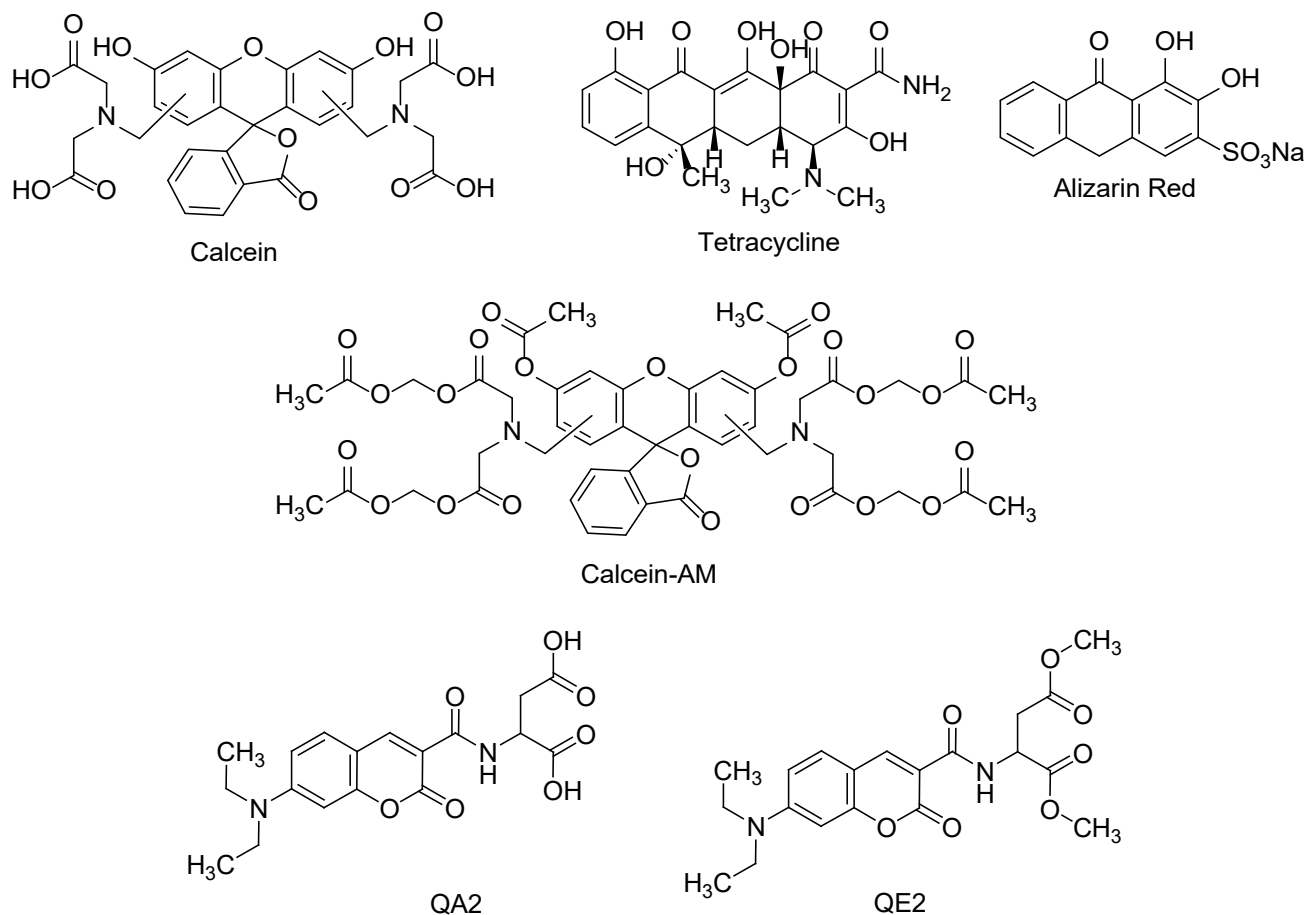


Fig.1. Structures of calcium-specific fluorescent dyes.

The dyes for calcium structures described above contain carboxyl and phenolic groups capable of binding with calcium ions. On the other hand, these groups cause a negative charge on the dye molecules, which prevents them from penetrating negatively charged cell membranes. The use of high concentrations of dyes results in nonspecific staining of organisms, including soft tissues (Mohler, 2003) and fully formed calcium structures, such as the central parts of mollusk valves (Gao et al., 2024) and fin ray segments (Lü et al., 2019). Moreover, the use of dyes in concentrations of hundreds of mg/L or the introduction of comparable amounts into feed may have toxic effects even after brief exposure (Gao et al., 2024). To solve this problem, it has been proposed (Tsien, 1981) to transform the acidic groups into ester groups, making the molecule neutral or even positively charged in the case of calcein. Acetoxymethyl is proposed as a modifying group, which is removed by enzymatic hydrolysis when entering a living cell. In the case of calcein, the new dye was named Calcein-AM and it is mainly used as a reagent to determine the vital status of cells. Calcein AM itself does not exhibit fluorescence, but it does so in living cells, allowing them to be distinguished from dead cells. Calcein AM is promising for visualizing calcium structures in living cells (Sviben et al., 2016), but examples of such works are few, which is due to the high cost of the dye (200 dollars/mg or more). The use of such an expensive dye is acceptable in cell cultures, but impossible when working in natural environments and aquaculture. In addition, the fluorescein fragment

in calcein emits in the yellow-green region of the spectrum, overlapping with the autofluorescence of mollusks (Delvene et al., 2022; Donaldson, 2020; Spires and North, 2022) and algae (Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007), which may complicate the interpretation of results.

The aim of this work was to synthesize a weakly basic analogue of the coumarin dye QA2 (Zelinskiy et al., 2023) containing ester groups capable of being converted into acids under the action of the corresponding enzymes. A synthesis strategy has been developed that allows the target product (QE2, Fig. 1) to be obtained in a single-step reaction without the intermediate formation of QA2. The ability of QE2 to penetrate living cells was studied using the dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. The staining of calcium structures was demonstrated using Baikal gastropods *B. baicalensis* and Baikal lake-river whitefish *Coregonus fluviatilis*.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

Acetonitrile was HPLC grade (Cryochrom, St. Petersburg, Russia). All other solvents and reagents were reagent grade (Vekton JSC, Petersburg, Russia). Ethanol (95 wt%) was refluxed with sodium hydroxide and distilled. Ethyl acetate was washed with an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride, and distilled. Dichloromethane and n-hexane were stirred with concentrated sulfuric acid for 3 hours, washed with dis-

tilled water, an aqueous sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride, and distilled. Dimethylformamide (DMF) was shaken for 30 minutes with anhydrous CuSO_4 , filtered through a Büchner funnel, distilled in vacuum and kept with 3A molecular sieves. Triethylamine was dried with CaH_2 and distilled. Succinimidyl ester of 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic and dimethyl L-aspartate hydrochloride were prepared following the techniques reported in (Berthelot et al., 2005) and (Thangavelu et al., 2017), respectively.

2.2. Instrumentation

Absorption, excitation and emission spectra were measured with SM-2203 spectrofluorimeter (CJSC Spectroscopy, Optics and Lasers – Modern Developments, Republic of Belarus, Minsk) in 10 mm quartz cuvette. A pulsed xenon lamp was used as an excitation source in the device. The relative quantum yield, Q_s , of the sample can be calculated using the following equation (Levitus, 2020):

$$Q_s = Q_R \left(\frac{Int_s}{Int_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_s}} \right) \left(\frac{n_s}{n_R} \right)^2$$

where the subscripts S and R denote the sample and reference respectively. Q_R is the known quantum yield of the reference standard, Int is the integrated fluorescence spectrum intensity, A is the absorbance of the solution at the excitation wavelength (λ_{ex}), and n is the refractive index of the solution solvent. Fluorescein disodium salt in 0.1 M NaOH was used as the reference standard.

Light and fluorescent microscopy was performed with MOTIC AE-31T inverted microscope with HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for green, yellow and red emission and 365 nm for blue emission. A Moticam Pro 205A camera was used to record the images.

Chromatographic experiments were performed with HPLC system Milichrom A-02 (EcoNova, Novosibirsk, Russia) with a column ProntoSIL-120-5-C18 (2×75 mm, $5 \mu\text{m}$) using gradient elution mode with a 0.05 M phosphate buffer of pH 6.86 as eluent A and acetonitrile as eluent B. The mobile phase's composition changed as follows: 0–1875 μL , 20–50% B; 1875–2500 μL , isocratic condition, 50% B. Eluent flow rate was set 0.150 mL/min, column temperature 35°C , sample volume 10 μL , analysis time 16.7 min. Detection wavelengths were 210 and 260 nm.

The ^1H NMR spectrum was recorded in CDCl_3 at room temperature on a Bruker DPX-400 spectrometer. Chemical shifts (δ in ppm) were measured with accuracy of 0.01, and referred to TMS.

2.3. Synthesis of dimethyl 2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)succinate (QE2)

To a magnetically stirred solution of succinimidyl ester of 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid (2.70 g, 7.53 mmol) in dry DMF (28 mL), dimethyl

L-aspartate hydrochloride (1.49 g, 7.54 mmol) was added at room temperature. After dissolution, triethylamine (0.98 g, 9.7 mmol) was added to the mixture. Stirring was continued for 8 hours and the reaction vessel was put into a refrigerator (10°C). In 15 hours, the reaction mixture was warmed to RT and quenched by adding 450 g of 3.1% of potassium carbonate aqueous solution and extracted with dichloromethane (4×100 mL). The combined extract was dried with anhydrous potassium carbonate and concentrated with a rotary evaporator. The reddish-brown liquid residue was separated by flash chromatography on a column (silica gel 40–63 μm , $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}=8:2$, $R_f=0.51$) using a SepaBean Machine T flash chromatograph. The target fraction was concentrated under reduced pressure and kept under rotary vane pump vacuum at $40\text{--}50^\circ\text{C}$ for 3 hours to give QE2 (Fig. 2) as a yellow solid (1.11 g, 36%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 9.57 (1H, d, $J=7.82$ Hz, H-7), 8.67 (1H, s, H-6), 7.42 (1H, d, $J=8.80$ Hz, H-5), 6.64 (1H, dd, $J=2.44, 8.80$ Hz, H-4), 6.50 (1H, d, $J=1.96$ Hz, H-3), 5.10 (1H, dt, $J=3.72, 7.83$ Hz, H-8), 3.79 (3H, s, H-10), 3.73 (3H, s, H-10), 3.46 (4H, q, $J=7.01$ Hz, H-2), 3.08 (1H, dd, $J=4.89, 16.63$ Hz, H-9) and 2.97 (1H, dd, $J=5.14, 16.88$ Hz, H-9), 1.25 (6H, t, $J=7.10$ Hz, H-1).

2.4. Hydrolytic stability of QE2

The stability of QE2 to hydrolysis was studied in aqueous solutions with pH 4.00 (acetate buffer, 0.05 M), 6.86 (phosphate buffer, 0.05 M), and 9.18 (borate buffer, 0.01 M). Samples were prepared by adding a methanol solution of the dye (0.25 mg/mL, 0.240 mL) to 1.260 mL of the corresponding buffer until a final dye concentration of 0.04 mg/mL (0.099 mM) was reached. The solutions were left at room temperature (25°C) in a dark place and analyzed by HPLC over time. The proportion of dye remaining in the solution was determined as the ratio of the dye peak area (absorbance at 260 nm) to the total area of the dye peak and the peaks of the decomposition products.

2.5. Staining living organisms with QE2 dye

2.5.1. Dinoflagellates

The strain *G. corollarium* SCCAP K-0983 was isolated from the northern part of the Baltic Sea, Sweden (Sundström et al., 2009). The monoculture was grown on f/2-Si medium (Guillard and Ryther, 1962) based

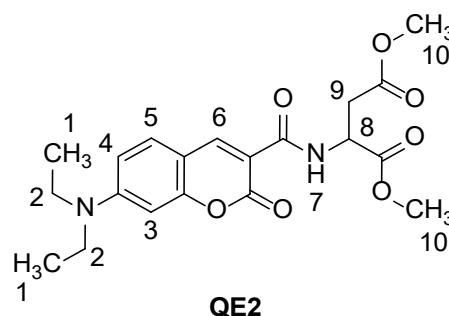


Fig.2. Structure of dye QE2.

on artificial seawater (salinity 11%). Cultivation was carried out in 25–50 ml plastic flasks at a temperature of 4 °C and illumination of 13–21 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ with a day:night interval of 12:12 h. To study dye uptake into cells, 5 μl of dye at a concentration of 100 μM was added to 0.5 ml of medium with dinoflagellates, and dye uptake into cells was studied using a fluorescence microscope.

2.5.2. Gastropods

B. baicalensis gastropods were collected by divers at a depth of 10–30 m in the vicinity of Listvyanka village. The mollusks were kept in three 3.6-liter aquariums with constant aeration at a temperature of 9°C and fed with filamentous Baikal algae. At the beginning of the experiment, 12 individuals were placed in each aquarium. Lighting was provided by daylight without direct sunlight, with a daylight intensity of 3–6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (May–July 2025).

After acclimatization for 7 days, an experiment was started to stain the shells with two dyes, QA2 and QE2, with the third aquarium serving as a control. Dyes were added to aquariums No. 1 and No. 2 to a concentration of 1 μM . Every week, 1.5 liters of water from the aquarium was replaced with 1.5 liters of fresh Baikal water, adding dyes to a concentration of 1 μM .

2.5.3. Fish

In this experiment, 6-month-old *C. fluviatilis* fry measuring 3.5 to 6 cm in length were used. The dye was administered both as an additive to the feed and directly into the aquarium. The fish were kept in glass aquariums at a temperature of 13°C with 12/12 day/night lighting cycles and constant aeration. Fifty percent of the water was replaced six times a week.

The feed was prepared by evenly moistening dry feed (LLC “NPK Ruslo”, Russia, malt, for whitefish and salmonids, size 0.3 mm) with a solution of QE2 in acetone (concentration 2 mg/ml) and then drying it in a vacuum at 35°C. After drying, the feed was impregnated with an aqueous solution of sodium alginate (0.05% by mass) and dried in a vacuum at 35°C. After drying, the feed was passed through a sieve with a pore size of 0.31 mm. The content of QE2 dye in the fish feed was 2 mg/g (4.94 $\mu\text{mol}/\text{g}$), and sodium alginate was 0.69 mg/g.

The aquarium used for the experiment involving the addition of dye to the feed contained 80 liters of water and 12 fish. The feed was administered at a rate

of 1.5 g per day (50% in the morning and 25% in the afternoon and evening).

When the dye was added to the aquarium, the water volume was 20 liters, the number of fish was 4, and the water change and feeding regime were similar to the previous experiment. The dye stock solution in DMSO (1 mM, 404.4 mg/L) was added every morning (5 mL) after the water change, diluting the stock solution in 1 L of water. On the first day of the experiment, 10 mL of the dye stock solution was added. The dye concentration in the water was 1 μM (404.4 $\mu\text{g}/\text{L}$).

3. Results and discussion

QE2 dye was prepared by the reaction of succinimidyl ester of 7-(diethylamino) coumarin-3-carboxylic acid with dimethyl L-aspartate hydrochloride (Fig. 3). The structure of the new dye was confirmed by ^1H NMR spectroscopy, and its purity was confirmed by HPLC. A study of the dye's behavior in water (Table 1) showed that it is sufficiently stable in neutral and slightly acidic environments, whereas in alkaline medium (pH = 9.18) it degrades by 50% within 4 hours.

The absorption, excitation, and emission spectra of the new dye (Figs. 4 and 5) are close to those of the QN2 and QA2 dyes (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023). The main absorption peak is in the 400–460 nm range with a shift to the blue region as the polarity of the solvent decreases in the water-ethanol-hexane row. The excitation and emission spectra behave similarly. In the case of hexane, additional peaks appear in the absorption and emission spectra. The quantum yield of fluorescence decreases sharply with increasing polarity of the medium (Table 2). Similar phenomena have been observed previously for coumarin-containing dyes (Annenkov et al., 2019 and references in this article) and were explained by the influence of the solvent on the aromatic system and an increase in the probability of non-radiative relaxation of the excited state of molecules in polar solvents.

Table 1. Change in the content of dye QE2 in solution, % of initial content

Time, h	pH 4.00	pH 6.86	pH 9.18
2	100	98	63
4	100	-	51
24	100	94	6
5 days	92	82	-

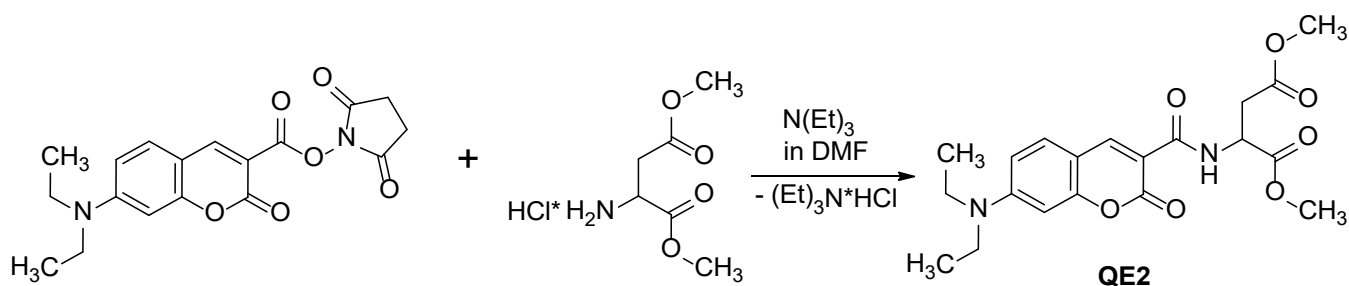


Fig.3. Scheme of dye QE2 synthesis.

Table 2. Spectral characteristics and relative fluorescence quantum yield (Q) for QE2

Solvent	Excitation wavelength, nm	ε ($\times 10^{-3}$ L·mol $^{-1}$ ·cm $^{-1}$)*	Q, %
Water	433	38.09	2.2
95% ethanol	423	39.84	11.1
hexane	405	40.31	99.3

Note: * Extinction coefficient for excitation wavelength

The ability of QE2 dye molecules to penetrate living cells was evaluated using *G. corollarium* dinoflagellate cells (Fig. 6). When QE2 was added to the culture medium at a concentration of 1 μ M, a characteristic blue fluorescence of the cells was observed. In the case of the acidic dye QA2, no cell staining was observed. Coumarin-containing dyes are capable of luminescence in the green region of the spectrum (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023), but only blue fluorescence was observed when staining dinoflagellates. The green region of the spectrum is located above 500 nm, and when transferred to a nonpolar solvent, the luminescence shifts to a shorter wavelength region, suggesting that QE2 is located in nonpolar vesicles. A sharp increase in the quantum yield of fluorescence in a nonpolar medium (Table 2) makes it possible to observe the luminescence of cells without removing the dye from the medium, which is a problem when using rhodamine dyes.

Cultivation of Baikal gastropods *B. baicalensis* in a medium with 1 μ M QE2 added (Fig. 7) resulted in the appearance of characteristic blue fluorescence of the shell on the side of the aperture, where the shell growth occurs. When fluorescence is excited by light with a wavelength of 470 nm (Fig. 7C), a red-yellow-green fluorescence of the shell is observed, noted both in the control group and when using the QA2 dye. These facts indicate the need to use dyes with blue fluorescence to detect calcium-mineralizing structures.

The keeping of *C. fluviatilis* fish in the presence of QE2 dye, added either to feed (2 mg/g) or to the aquarium (1 μ M), resulted in fluorescent staining of the fish (Fig. 8). Observation of whole organisms (Fig. 8B) is hampered by light scattering, including on the protective slime layer covering the bodies of fish. Nevertheless, the fluorescence of the caudal fin and spine can be noted. Fluorescence in the abdomi-

nal cavity is probably associated with the presence of dye-containing feed. Mechanical removal of muscle tissue (Fig. 8C) allows for a clearer view of the staining of the spine and fin. Microphotographs of a more purified preparation (Fig. 8D-G) also indicate a significantly brighter fluorescence of samples with QE2 compared to the autofluorescence of control preparations. In the case of the caudal fin (Fig. 8H-J), the boundaries of the bone segments are stained, especially the joints between segments (Fig. 8J). In contrast to the action of high concentrations of acidic dyes (Lü et al., 2019), there is no nonspecific staining of previously formed bone segments. The introduction of dye into aquarium water led to similar results with a significantly higher reagent consumption (2.02 mg per fish per day compared to 0.25 mg when QE2 was added to the feed).

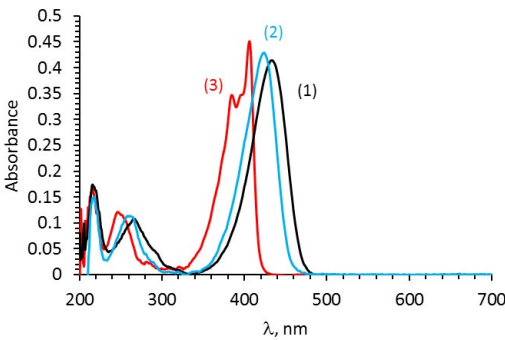


Fig.4. Absorption spectra of QE2 solutions in various solvents: (1) – water, (2) – ethanol, (3) – hexane. Concentration 10 μ M.

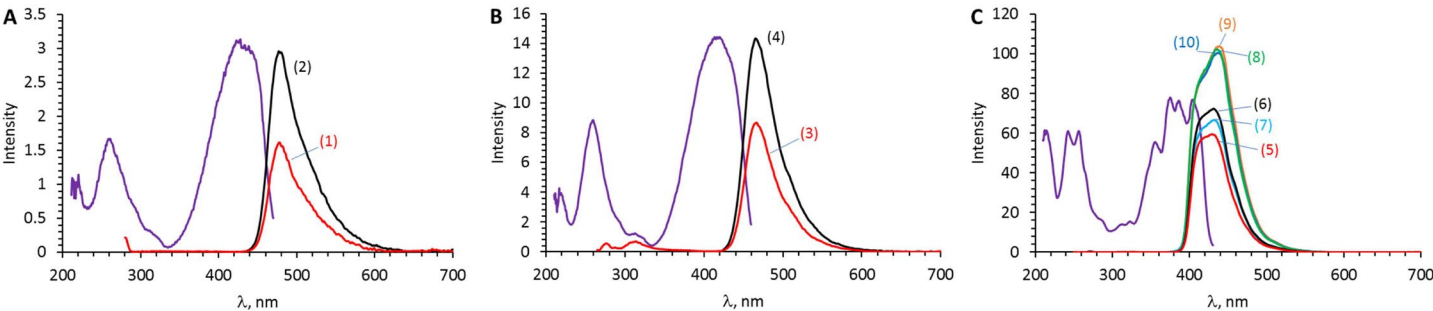


Fig.5. Excitation and fluorescence spectra of QE2 solutions in water (A), 95% ethanol (B), and hexane (C). Monochromator slits 5 nm (input) and 5 nm (output). Dye concentration 10 μ M. Excitation spectra were measured for fluorescence at 478 (A), 466 (B), and 437 nm (C). Excitation wavelengths, in nm: (1), (3) – 260, (2) – 428, (4) – 420, (5) – 242, (6) – 256, (7) – 355, (8) – 374, (9) – 385, (10) – 403.

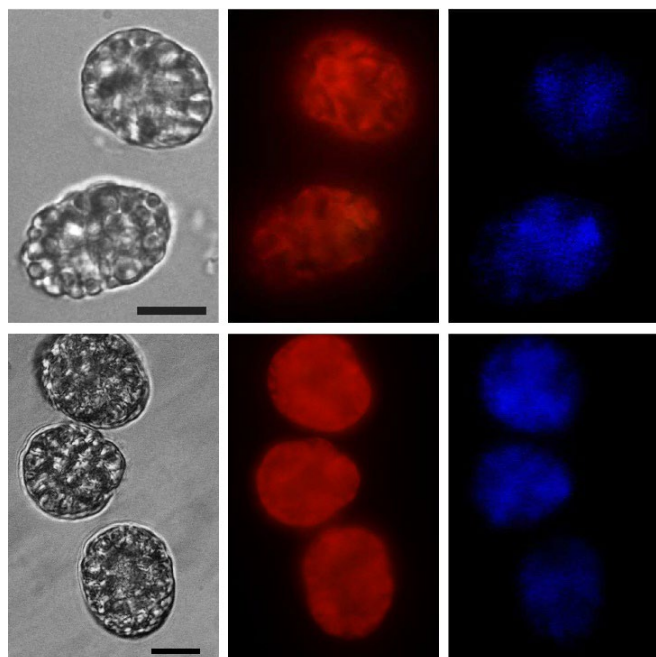


Fig.6. Microphotographs of dinoflagellate *G. corollarium* 5 min after adding QE2 dye at a concentration of 1 μ M. Scale bar: 10 μ m.

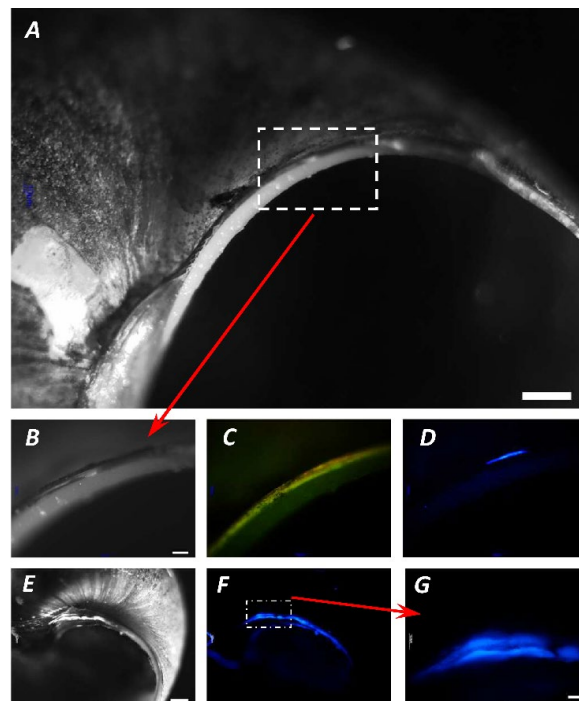


Fig.7. Visible (A, B, and E) and fluorescent (C, D, F, and G) microphotographs of *B. baicalensis* gastropod shells cultivated in the presence of 1 μ M QE2, viewed from the aperture. A-D – cultivation for one month, E-G – two months. Scale bar: 500 (A, E, and F) and 100 (B-D and G) μ m.

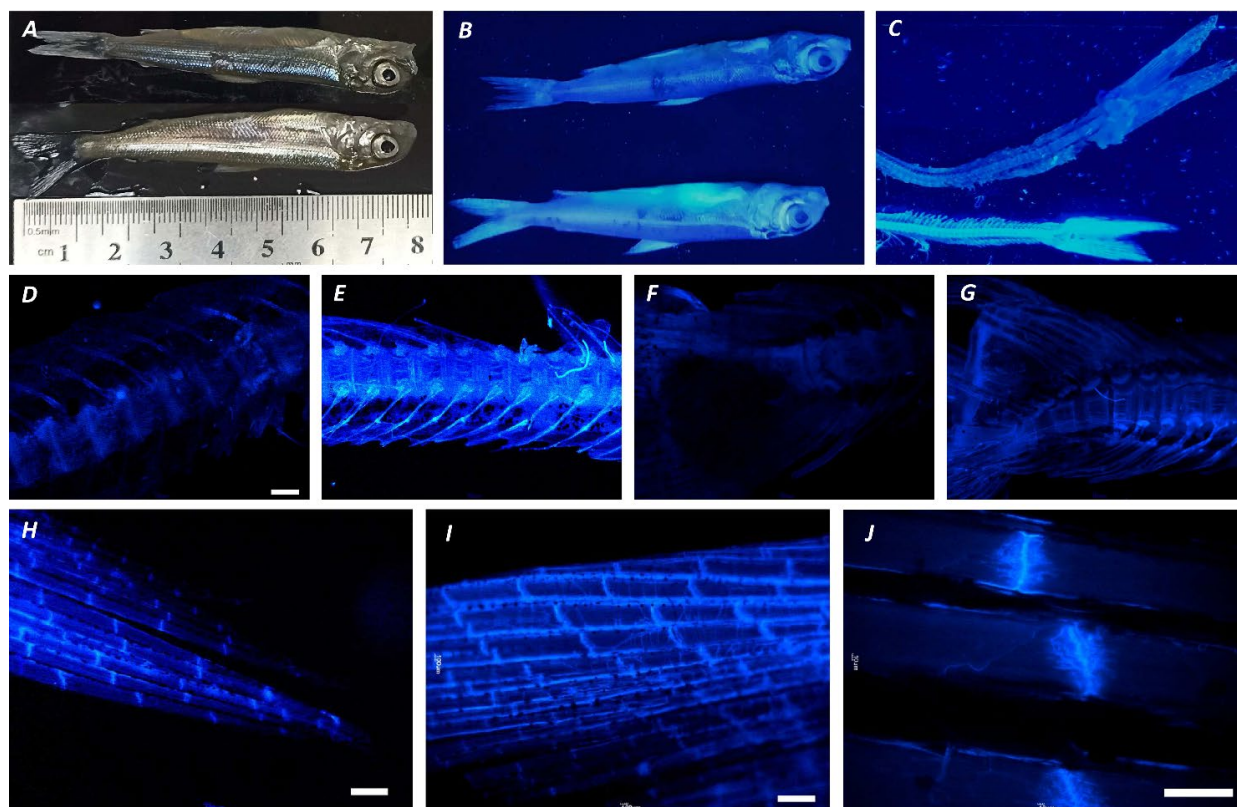


Fig.8. Photographs of *C. fluviatilis* fish under natural lighting (A) and under LED lighting with a wavelength of 365 nm (B, C). C – fish skeletons after mechanical removal of muscle tissue. The upper image refers to a specimen from the control group, the lower one – from the experimental group, after cultivation for 14 days with feed modified with QE2 dye. D-J – fluorescent microphotographs: of the spine (D-G) and caudal fin (H-J) after cleaning by soaking in water at 100°C for 5 minutes. D and F – control group samples, images in pairs D-E and F-G were obtained with the same microscope video camera settings. Scale bar: 500 (D-G and H-I) and 100 μ m (J).

4. Conclusions

An effective method has been developed for synthesis of the new fluorescent dye QE2. It contains a weakly basic amino group and two carboxyl groups in the form of methyl esters, which are capable of hydrolysis in a weakly alkaline medium or under the action of enzymes. The dye is able to easily penetrate living cells, as demonstrated by the example of dinoflagellate culture. Cultivation of organisms with calcium skeletons (gastropods, fish) in the presence of QE2 leads to fluorescent staining of growth areas (gastropod shell apertures, fish spine and fin elements). The fluorescence of QE2 and its hydrolysis product QA2 (Zelinskiy et al., 2023) significantly depends on the polarity of the environment, intensifying in a nonpolar environment with a simultaneous shift in emission from the green-blue to the blue region.

Thus, the QE2 dye can be used to track areas of calcium mineralization, assess the polarity of cell organelles, tag fish for experiments in ecology and aquaculture, and stain cell cultures and skeletal elements for confocal microscopy studies.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project # 122012600070-9. The authors would like to thank A. P. Fedotov and I. V. Khanaev for providing gastropod samples, as well as the Ultramicroanalysis Center and the Experimental Freshwater Aquarium Complex of Baikal Hydrobionts (LIN SB RAS) for providing equipment.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407: 44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Berthelot T., Talbot J.C., Lain G. et al. 2005. Synthesis of Nε-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and Nε-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science* 11: 153–160. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)
- Davis R.P., Honeyfield D.C. 2020. Efficacy and practical limitations of calcein as a marking agent in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to sunlight and frozen sample storage. *Fisheries Research* 232: 105736. DOI: [10.1016/j.fishres.2020.105736](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105736)
- Delvene G., Lozano R.P., Piñuela L. et al. 2022. Autofluorescence of microborings in fossil freshwater bivalve shells. *Lethaia* 55(4): 1–12. DOI: [10.18261/let.55.4.7](https://doi.org/10.18261/let.55.4.7)
- Donaldson L. 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25: 2393. DOI: [10.3390/molecules25102393](https://doi.org/10.3390/molecules25102393)
- Gao J., Xie X., Liu X.-F. et al. 2024. Efficacy of calcein as a chemical marker of *Potamocorbula laevis*. *Frontiers in Marine Science* 11: 1379571. DOI: [10.3389/fmars.2024.1379571](https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1379571)
- González-Pabón M.A., Tortolero-Langarica J.J.A., Calderon-Aguilera L.E. et al. 2021. Low calcification rate, structural complexity, and calcium carbonate production of *Pocillopora* corals in a biosphere reserve of the central Mexican Pacific. *Marine Ecology* 42: e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)
- Kucki M., Fuhrmann-Lieker T. 2012. Staining diatoms with rhodamine dyes: control of emission colour in photonic biocomposites. *Journal of the Royal Society Interface* 9: 727–733. DOI: [10.1098/rsif.2011.0424](https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0424)
- Levitus M. 2020. Tutorial: measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)
- Lü H., Fu M., Zhang Z. et al. 2019. Marking fish with fluorochrome dyes. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 28: 117–135. DOI: [10.1080/23308249.2019.1681358](https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1681358)
- Mohler J.W. 2003. Producing fluorescent marks on atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction. *North American Journal of Fisheries Management* 23: 1108–1113. DOI: [10.1577/M02-143](https://doi.org/10.1577/M02-143)
- Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P. et al. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304: 297–300. DOI: [10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)
- Prentice J.A., J. Schlechte W., Betsill R.K. 2006. Longevity of oxytetracycline and calcein in double-marked batches of fry and fingerling largemouth bass. *Proceedings of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* 60: 174–179.
- Ramesh K., Hu M.Y., Thomsen J. et al. 2017. Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nature Communications* 8: 1709. DOI: [10.1038/s41467-017-01806-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01806-8)
- Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent staining of living plant cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M. et al. (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols*. Cham, pp.153–165. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)
- Shimizu K., Del Amo Y., Brzezinski M.A. et al. 2001. A novel fluorescent silica tracer for biological silification studies. *Chemistry and Biology* 8: 1051–1060. DOI: [10.1016/s1074-5521\(01\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00072-2)
- Spires J.E., North E.W. 2022. Marking the shells of juvenile and adult eastern oysters, *Crassostrea virginica*, with the fluorochrome dye calcein and measuring growth and mortality after marking. *Journal of Molluscan Studies* 88: eyac004. DOI: [10.1093/mollus/eyac004](https://doi.org/10.1093/mollus/eyac004)
- Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium corollarium* sp. nov. (dinophyceae)—a new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation events in the Baltic sea. *Journal of Phycology* 45: 938–952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)
- Sviben S., Gal A., Hood M.A. et al. 2016. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga. *Nature Communications* 216(7): 11228. DOI: [10.1038/ncomms11228](https://doi.org/10.1038/ncomms11228)
- Tang Y.Z., Dobbs F.C. 2007. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7): 2306–2313. DOI: [10.1128/AEM.01741-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01741-06)
- Thangavelu B., Mutthamsetty V., Wang Q. et al. 2017. Design and optimization of aspartate N-acetyltransferase

inhibitors for the potential treatment of Canavan disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25: 870–885. DOI: [10.1016/j.bmc.2016.11.060](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.060)

Tsien R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290(5806): 527–528. DOI: [10.1038/290527a0](https://doi.org/10.1038/290527a0)

Vidavsky N., Masic A., Schertel A. et al. 2015. Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *Journal of Structural Biology* 192(3): 358–365. DOI: [10.1016/j.jsb.2015.09.017](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.09.017)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244–252. DOI: [10.31951/2658-3518-2](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2)

Слабоосновный флуоресцентный краситель для прижизненной окраски кальциевых структур в живых организмах

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Зелинский С.Н.*^{ORCID}, Даниловцева Е.Н.^{ORCID}, Глызина О.Ю.^{ORCID}, Суханова Л.В.^{ORCID},
Стрелова М.С.^{ORCID}, Пальшин В.А.^{ORCID}, **Анненков В.В.**^{ORCID}

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 3 ул. Улан-Баторская, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Прижизненные красители, способные окрашивать формирующиеся скелетные элементы из карбоната или фосфата кальция, содержат карбоксильные группы, способные к взаимодействию с ионами кальция. Данные красители востребованы как в исследованиях механизмов биоминерализации, так и при введении меток в рыб и моллюсков при экологических и аквакультурных экспериментах. В то же время, молекулы красителей, несущие отрицательный заряд, например, кальцеина, плохо проникают через клеточные мембраны, что приводит к необходимости использования высоких концентраций, вызывающих токсические эффекты и неспецифическую окраску. В данной статье разработан эффективный метод синтеза нового флуоресцентного красителя QE2, содержащего слабоосновную аминогруппу и две карбоксильные группы в форме метиловых эфиров, способных к гидролизу в слабощелочной среде или под действием ферментов. Флуоресценция QE2 и продукта его гидролиза существенно зависит от полярности среды, усиливаясь в неполярном окружении с одновременным смещением испускания из зелёно-голубой в синюю область. Краситель способен легко проникать в живые клетки, что показано на примере культуры динофлагеллят. Культивирование организмов с кальциевыми скелетами (гастроподы, рыбы) в присутствии QE2 приводит к флуоресцентному окрашиванию зон роста (устья раковин гастропод, элементы скелета и плавников рыб). Краситель QE2 может найти применение для отслеживания зон кальциевой минерализации, оценки полярности клеточных органелл, введения меток в рыбы для экспериментов в области экологии и аквакультур, окрашивания клеточных культур и скелетных элементов для исследования методом конфокальной микроскопии.

Ключевые слова: флуоресценция, витальный краситель, кумарин, кальциевые скелеты, динофлагелляты, гастроподы, сиговые рыбы

Для цитирования: Зелинский С.Н., Даниловцева Е.Н., Глызина О.Ю., Суханова Л.В., Стрелова М.С., Пальшин В.А., Анненков В.В. Слабоосновный флуоресцентный краситель для прижизненной окраски кальциевых структур в живых организмах // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 6. - С. 1289-1304. DOI: [10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2025-A-6-1289)

1. Введение

Прижизненное окрашивание скелетных элементов живых организмов флуоресцентными красителями используется для мониторинга роста, изучения влияния разных факторов на организмы, а также при исследовании механизмов образования биоминеральных структур. В случае организмов с кремнистым скелетом (диатомовые водоросли, губки) применяются соединения, содержащие заместители с электронодонорными атомами азота при флуорофоре. Данные красители легко про-

никают в биоминерализирующие клетки и связываются с растущими кремнистыми структурами, что позволяет проследивать рост этих структур (Annenkov et al., 2010; Kucki and Fuhrmann-Lieker, 2012; Shimizu et al., 2001). Для окраски скелетных элементов на основе карбоната или фосфата кальция получили распространение кальцеин, ализарин и тетрациклин (Рис. 1) (González-Pabón et al., 2021; Mount et al., 2004; Prentice et al., 2006; Vidavsky et al., 2015). Подобные соединения востребованы в экологических исследованиях и работах в области аквакультур для введения флуоресцентных меток

*Автор для переписки. Адрес e-mail: jt1233@mail.ru (С. Зелинский)

Поступила: 02 ноября 2025;

Принята после доработки: 01 декабря 2025;

Опубликована online: 25 декабря 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



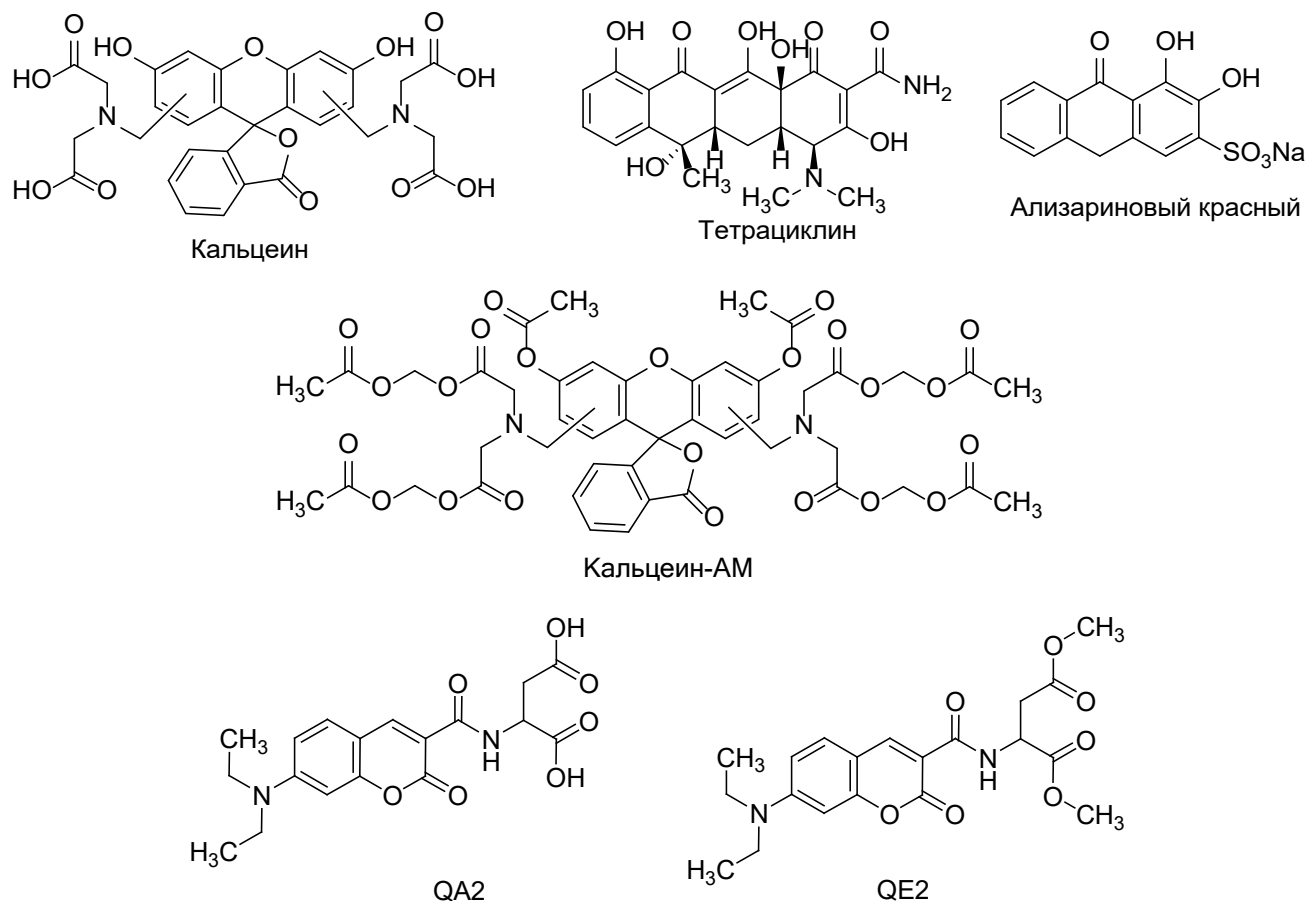


Рис.1. Структурные формулы кальций-специфичных флуоресцентных красителей.

в панцири моллюсков, плавники рыб для последующего отслеживания особей в природной среде. Красители вводятся с кормом или в аквариальную воду в достаточно высоких концентрациях (20-500 мкМ) (Davis and Honeyfield, 2020; Gao et al., 2024; Prentice et al., 2006; Ramesh et al., 2017), значительно превышающих концентрацию красителей в экспериментах с кремнистыми организмами (0,5-1 мкМ). Ранее (Zelinskiy et al., 2023) мы сообщали о синтезе кумаринового красителя QA2 (Рис. 1), который хорошо окрашивает синтетический карбонат и фосфат кальция. Попытки использовать QA2 в концентрации 1 мМ для прижизненной окраски панцирей байкальских гастропод *Benedictia baicalensis* оказались неудачными.

Описанные выше красители для кальциевых структур содержат карбоксильные и фенольные группы, способные к связыванию с ионами кальция. С другой стороны, эти группы обуславливают отрицательный заряд молекул красителей, что препятствует их проникновению через отрицательно заряженные клеточные мембраны. Использование высоких концентраций красителей приводит к неспецифической окраске организмов, включая мягкие ткани (Mohler, 2003) и полностью сформированные кальциевые структуры, например, центральные части створок моллюсков (Gao et al., 2024) и сегменты лучей плавников (Lü et al., 2019). Кроме того, использование красителей в концентрации сотен мг/л или введение сопоставимых количеств в корм может оказать токсическое воздействие даже при непродолжительном контакте (Gao et al., 2024). Для

решения этой проблемы предложено (Tsien, 1981) трансформировать кислотные группы в эфирные, делая молекулу нейтральной или даже положительно заряженной в случае кальцеина. В качестве модифицирующей группы предложена ацетоксиметильная, которая при попадании в живую клетку удаляется за счёт ферментативного гидролиза. В случае кальцеина новый краситель получил наименование кальцеин АМ и он используется, в основном, в качестве реагента, позволяющего понять витальный статус клеток. Сам кальцеин АМ не обладает флуоресценцией, но начинает светиться в живых клетках, что позволяет отличать их от мёртвых. Кальцеин АМ перспективен для визуализации кальциевых структур в живых клетках (Sviben et al., 2016), но примеры подобных работ немногочисленны, что связано с высокой стоимостью красителя (200 и более долларов/мг). Использование столь дорогого красителя допустимо в случае клеточных культур, но невозможно при работах в природной среде и аквакультурах. Кроме того, флуоресцентный фрагмент в кальцеине излучает в жёлто-зелёной области спектра, перекрываясь с автофлуоресценцией моллюсков (Delvene et al., 2022; Donaldson, 2020; Spires and North, 2022) и водорослей (Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007), что может затруднить интерпретацию результатов.

Целью данной работы являлся синтез слабоосновного аналога кумаринового красителя QA2 (Zelinskiy et al., 2023), содержащего эфирные группы, способные к превращению в кислотные под действием соответствующих ферментов.

Разработана стратегия синтеза, позволяющая получать целевой продукт (QE2, Рис. 1) одностадийной реакцией, без промежуточного образования QA2. Изучена способность QE2 проникать в живые клетки на примере динофлагеллят *Gymnodinium corollarium*. Окрашивание кальциевых структур продемонстрировано с использованием байкальских гастропод *B. baicalensis* и байкальского озерно-речного сига *Coregonus fluviatilis*.

2. Материалы и методы

2.1. Химические реагенты

Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил сорта «0» («Криохром», Санкт-Петербург, Россия). Все остальные растворители и реагенты были квалификации «хч» (ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург, Россия). Этанол (95 мас.%) кипятили с гидроксидом натрия и перегоняли. Этилацетат промывали водным раствором бикарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция и перегоняли. Дихлорметан и н-гексан перемешивали с концентрированной серной кислотой в течение 3 часов, промывали дистиллированной водой, водным раствором бикарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция и перегоняли. Диметилформамид (ДМФА) встряхивали в течение 30 минут с безводным CuSO_4 , фильтровали через воронку Бюхнера, перегоняли в вакууме и выдерживали с молекулярными ситами 3А. Триэтиламин сушили над CaH_2 и перегоняли. Сукцинимидиловый эфир 7-диэтиламинокумарин-3-карбоновой кислоты и гидрохлорид диметил-L-аспартата получены по методикам, описанным в (Berthelot et al., 2005) и (Thangavelu et al., 2017), соответственно.

2.2. Приборы

Спектры поглощения, возбуждения и испускания измеряли на спектрофлуориметре CM-2203 (ЗАО «Спектроскопия, Оптика и Лазеры – Авангардные Разработки», Республика Беларусь, г. Минск) в кварцевой кювете толщиной 10 мм. В качестве источника возбуждения в приборе использовалась импульсная ксеноновая лампа. Относительный квантовый выход флуоресценции рассчитывали по формуле (Levitus, 2020):

$$Q_S = Q_R \left(\frac{Int_S}{Int_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_S}} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

где подстрочные S и R обозначают краситель и стандарт сравнения. Q_R – известный квантовый выход стандарта сравнения, Int – интеграл спектра флуоресценции, A – поглощение при длине волны возбуждения флуоресценции (λ_{ex}), n – коэффициент преломления растворителя. В качестве стандарта сравнения использовали динатриевую соль флуоресцеина в 0,1 М NaOH.

Световую и флуоресцентную микроскопию проводили с помощью инвертированного микроскопа MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103

W/2 OSRAM. Длина волны возбуждения составляла 470 нм для красной, зелёной и жёлтой эмиссии и 365 нм для синей эмиссии. Для записи изображений использовали камеру Moticam Pro 205A.

Аналитическую хроматографию проводили с использованием ВЭЖХ-системы «Милихром А-02» (ЭкоНова, Новосибирск, Россия) с колонкой ProntoSIL-120-5-C18 (2 × 75 мм, 5 мкм) в градиентном режиме элюирования с использованием 0,05 М фосфатного буфера с pH 6,86 в качестве элюента А и ацетонитрила в качестве элюента В. Состав подвижной фазы изменялся следующим образом: 0–1875 мкл, 20–50% В; 1875–2500 мкл, изократически, 50% В. Скорость потока элюента составляла 150 мкл/мин, температура колонки 35 °С, объем пробы 10 мкл, время анализа 16,7 мин. Длины волн детектирования составляли 210 и 260 нм.

^1H ЯМР спектр записали для раствора в CDCl_3 при комнатной температуре на спектрометре Bruker DPX-400. Химические сдвиги (δ в м.д.) измеряли с точностью 0,01 относительно TMS.

2.3. Синтез диметил 2-(7-(диэтиламино)-2-оксо-2Н-хромен-3-карбоксамида) сукцината (QE2)

К перемешиваемому на магнитной мешалке раствору сукцинимидилового эфира 7-диэтиламинокумарин-3-карбоновой кислоты (2,70 г, 7,53 ммоль) в сухом ДМФА (28 мл) при комнатной температуре добавили гидрохлорид диметил-L-аспартата (1,49 г, 7,54 ммоль). После растворения к смеси добавили триэтиламин (0,98 г, 9,7 ммоль). Перемешивание продолжали в течение 8 часов, затем реакционный сосуд поместили в холодильник (10 °С). Через 15 часов реакционную смесь нагрели до комнатной температуры, добавили в неё 450 г 3,1% водного раствора карбоната калия и проэкстрагировали дихлорметаном (4 × 100 мл). Объединенный экстракт высушили безводным карбонатом калия и сконцентрировали на роторном испарителе. Красновато-коричневый жидкий остаток подвергли разделению методом флэш-хроматографии на колонке (силикагель 40–63 мкм, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt} = 8:2$, $R_f = 0,51$) с помощью флэш-хроматографа SepaBeap Machine T. Целевую фракцию концентрировали при пониженном давлении и выдерживали под вакуумом масляного насоса при 40–50 °С в течение 3 часов, получив QE2 (Рис. 2)

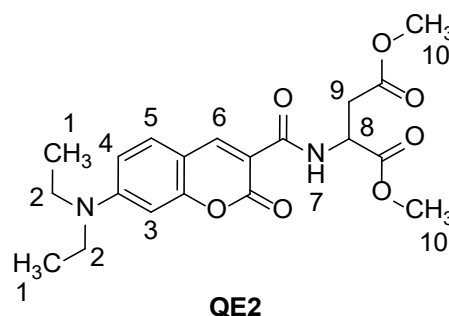


Рис.2. Структура красителя QE2.

в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ (м.д.): 9.57 (1H, d, $J=7,82$ Hz, H-7), 8.67 (1H, s, H-6), 7.42 (1H, d, $J=8,80$ Hz, H-5), 6.64 (1H, dd, $J=2,44, 8,80$ Hz, H-4), 6.50 (1H, d, $J=1,96$ Hz, H-3), 5.10 (1H, dt, $J=3,72, 7,83$ Hz, H-8), 3.79 (3H, s, H-10), 3.73 (3H, s, H-10), 3.46 (4H, q, $J=7,01$ Hz, H-2), 3.08 (1H, dd, $J=4,89, 16,63$ Hz, H-9) и 2.97 (1H, dd, $J=5,14, 16,88$ Hz, H-9), 1.25 (6H, t, $J=7,10$ Hz, H-1).

2.4. Устойчивость QE2 к гидролизу

Устойчивость к гидролизу QE2 изучали в водных растворах с pH 4,00 (ацетатный буфер, 0,05 М), 6,86 (фосфатный буфер, 0,05 М) и 9,18 (боратный буфер, 0,01 М). Образцы готовили добавлением метанольного раствора красителя (0,25 мг/мл, 0,240 мл) к 1,260 мл соответствующего буфера до достижения конечной концентрации красителя 0,04 мг/мл (0,099 мМ). Растворы оставляли при комнатной температуре (25 °C) в темном месте и анализировали методом ВЭЖХ во времени. Долю красителя, оставшегося в растворе, определялся как отношение площади пика красителя (поглощение на 260 нм) к общей площади пика красителя и пиков продуктов разложения.

2.5. Окрашивание живых организмов красителем QE2

2.5.1. Динофлагелляты

Штамм *G. corollarium* SCCAP K-0983 выделен из северной части Балтийского моря, Швеция (Sundström et al., 2009). Монокультуру выращивали на среде f/2-Si (Guillard and Ryther, 1962) на основе искусственной морской воды (солёность 11%). Культивирование проводили в пластиковых колбах объёмом 25–50 мл при температуре 4 °C и освещённости 13–21 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ с интервалом день: ночь 12: 12 ч. Для изучения вхождения красителя в клетку к 0,5 мл среды с динофлагеллятами добавляли 5 мкл красителя концентрацией 100 мМ и изучали вхождение красителя в клетки с помощью флуоресцентного микроскопа.

2.5.2. Гастроподы

Гастроподы *B. baicalensis* собирались водозадами на глубине 10–30 м в районе посёлка Листвянка. Моллюски содержали в трёх аквариумах объёмом 3,6 л с постоянной аэрацией воздухом при температуре 9°C, в качестве корма использовали нитчатые байкальские водоросли. В начале эксперимента в каждый аквариум поместили по 12 особей. Освещение осуществляли дневным светом без прямых солнечных лучей с интенсивностью дневного света 3–6 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ (май-июль 2025 года).

После акклиматизации в течение 7 дней начат эксперимент по окрашиванию раковин двумя красителями QA2 и QE2, третий аквариум был контролем. В аквариумы №1 и №2 были добавлены красители до концентрации 1 мМ. Каждую неделю

меняли 1,5 л воды из аквариума на 1,5 л свежей байкальской воды, добавляя красители до концентрации 1 мМ.

2.5.3. Рыбы

В эксперименте использовали мальков *C. fluviatilis* в возрасте 6 месяцев, длиной от 3,5 до 6 см. Краситель вводили как добавлением в корм, так и непосредственным введением в аквариум. Рыбы содержались в стеклянных аквариумах, при температуре 13°C со сменой освещения день/ночь в режиме 12/12 при постоянной аэрации воздухом. Замена 50% воды проводилась шесть раз в неделю.

Приготовление корма осуществляли равномерным смачиванием сухого корма (ООО «НПК Русло», Россия, мальковый, для сиговых и лососевых рыб, размер 0,3 мм) раствором QE2 в ацетоне (концентрация 2 мг/мл) и дальнейшей сушкой в вакууме при 35°C. После высушивания корм пропитывали водным раствором альгината натрия (0,05 масс %) и высушивали в вакууме при 35°C. После сушки корм пропускали через сито с размером пор 0,31 мм. Содержание красителя QE2 в корме для рыб составляло 2 мг/г (4,94 мкмоль/г), альгината натрия 0,69 мг/г.

Аквариум для эксперимента с введением красителя в корм содержал 80 л воды и 12 рыб. Корм вводили по 1,5 г в сутки (50% утром и по 25% днем и вечером).

При добавлении красителя в аквариум объём воды составлял 20 л, количество рыб – 4, смена воды и режим кормления аналогичны предыдущему эксперименту. Стоковый раствор красителя в ДМСО (1 мМ, 404,4 мг/л) добавляли каждый день утром (по 5 мл) после смены воды, разбавляя сток в 1 л воды. В первый день эксперимента добавили 10 мл стокового раствора красителя. Концентрация красителя в воде составляла 1 мМ (404,4 мкг/л).

3. Результаты и обсуждение

Краситель QE2 получен путем реакции сукцинимидилового эфира 7-(диэтиламино) кумарин-3-карбоновой кислоты с гидрохлоридом диметил-L-аспартата (Рис. 3). Структура нового красителя подтверждена спектроскопией ^1H ЯМР, чистота – методом ВЭЖХ. Изучение состояния красителя в воде (Таблица 1) показало его достаточную устойчивость в нейтральной и слабокислой среде, тогда как в щелочной среде (pH=9,18) он разрушается на 50% за 4 часа.

Таблица 1. Изменение содержания красителя QE2 в растворе, % от исходного.

Время, ч	pH 4.00	pH 6.86	pH 9.18
2	100	98	63
4	100	-	51
24	100	94	6
5 суток	92	82	-

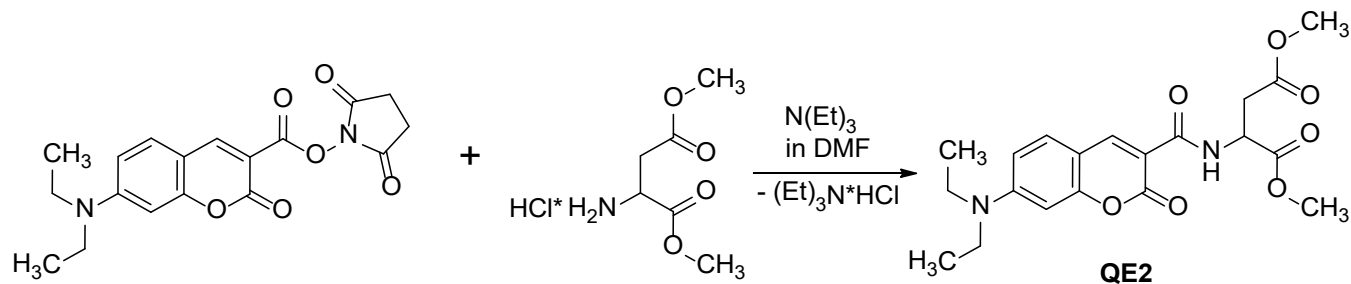


Рис.3. Схема синтеза красителя QE2.

Спектры поглощения, возбуждения и испускания нового красителя (Рис. 4, 5) близки к спектрам красителей QN2 и QA2 (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023). Основной пик поглощения находится в области 400-460 нм со сдвигом в голубую область при понижении полярности растворителя в ряду вода – этанол – гексан. Аналогичным образом ведут себя спектры возбуждения и испускания. В случае гексана в спектрах поглощения и испускания проявляются дополнительные пики. Квантовый выход флуоресценции резко понижается при повышении полярности среды (Таблица 2). Аналогичные явления наблюдались ранее для кумарин-содержащих красителей (Annenkov et al., 2019; и литература в этой статье) и объяснялись влиянием растворителя на ароматическую систему и повышением вероятности безызлучательной релаксации возбужденного состояния молекул в полярных растворителях.

Возможность проникновения молекул красителя QE2 в живые клетки оценена с использованием клеток динофлагеллят *G. corollarium* (Рис. 6). При добавлении в культуральную среду QE2 в концентрации 1 мкМ наблюдали характерное синее свечение клеток. В случае кислого красителя QA2 окрашивания клеток не наблюдали. Кумарин-содержащие красители способны к свечению в зелёной области спектра (Annenkov et al., 2019; Zelinskiy et al., 2023), но при окрашивании динофлагеллят наблюдали только синюю флуоресценцию. Зелёная область спектра расположена выше 500 нм, а при переходе в неполярный растворитель свечение сдвигается в более коротковолновую область, что позволяет предположить нахождение QE2 в неполярных везикулах. Резкое повышение квантового выхода флуоресценции в неполярной среде (Таблица 2) приво-

дит к возможности наблюдения свечения клеток без удаления красителя из среды, что представляет определённую проблему при использовании родаминовых красителей.

Таблица 2. Спектральные характеристики и относительный квантовый выход флуоресценции (Q) для QE2

Растворитель	Длина волны возбуждения, нм	ϵ ($\times 10^{-3}$ л·моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$)*	Q, %
Вода	433	38,09	2,2
95% этанол	423	39,84	11,1
гексан	405	40,31	99,3

Примечание: * Коэффициент экстинкции для длины волны возбуждения

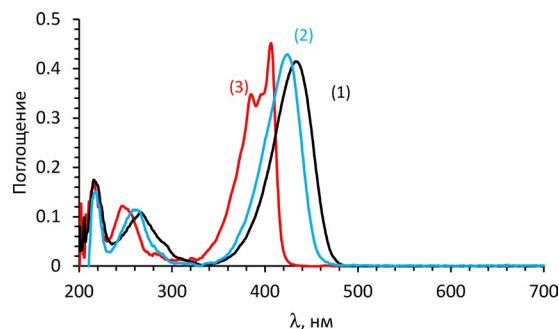


Рис.4. Спектры поглощения растворов QE2 в различных растворителях: (1) – вода, (2) – этанол, (3) – гексан. Концентрация 10 μМ.

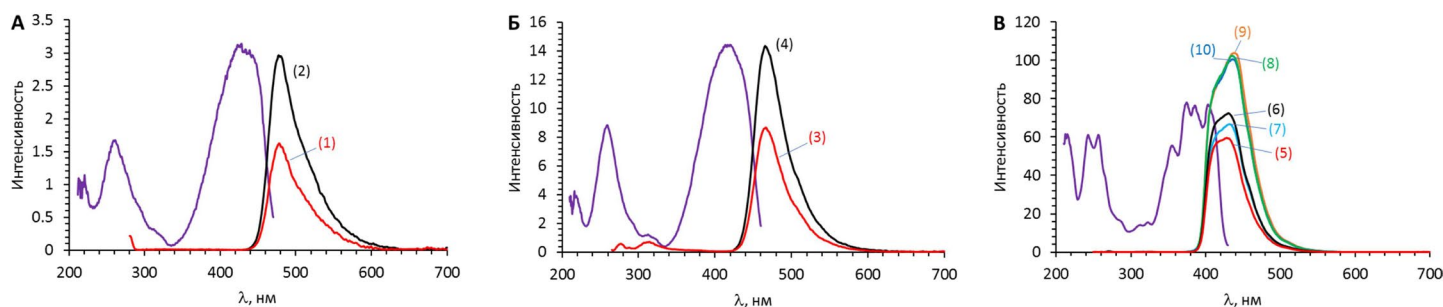


Рис.5. Спектры возбуждения и флуоресценции растворов QE2 в воде (А), 95% этаноле (Б) и гексане (В). Щели монохроматоров 5 (на вход) и 5 (на выход) нм. Концентрация красителя 10 μМ. Спектры возбуждения измеряли для флуоресценции при 478 (А), 466 (В) и 437 нм (В). Длины волн возбуждения, в нм: (1), (3) – 260, (2) – 428, (4) – 420, (5) – 242, (6) – 256, (7) – 355, (8) – 374, (9) – 385, (10) – 403.

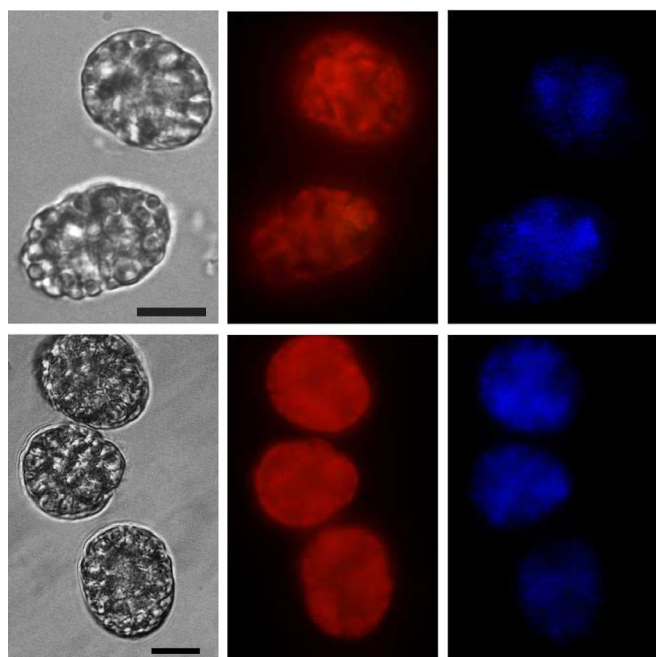


Рис.6. Микрофотографии динофлагеллят *G. corollarium* через 5 мин после добавления красителя QE2 в концентрации 1 μM . Масштаб: 10 мкм.

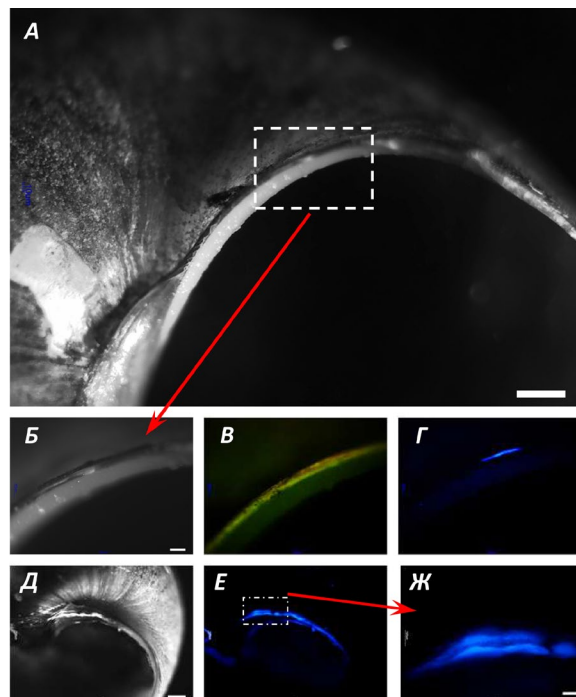


Рис.7. Видимые (А, Б и Д) и флуоресцентные (В, Г, Е и Ж) микрофотографии раковин гастропод *B. Baicalensis* культивированных в присутствии 1 μM QE2, вид со стороны устья. А-Г – культивирование в течение одного, Д-Ж – двух месяцев. Масштаб: 500 (А, Д и Е) и 100 (Б-Г и Ж) мкм.

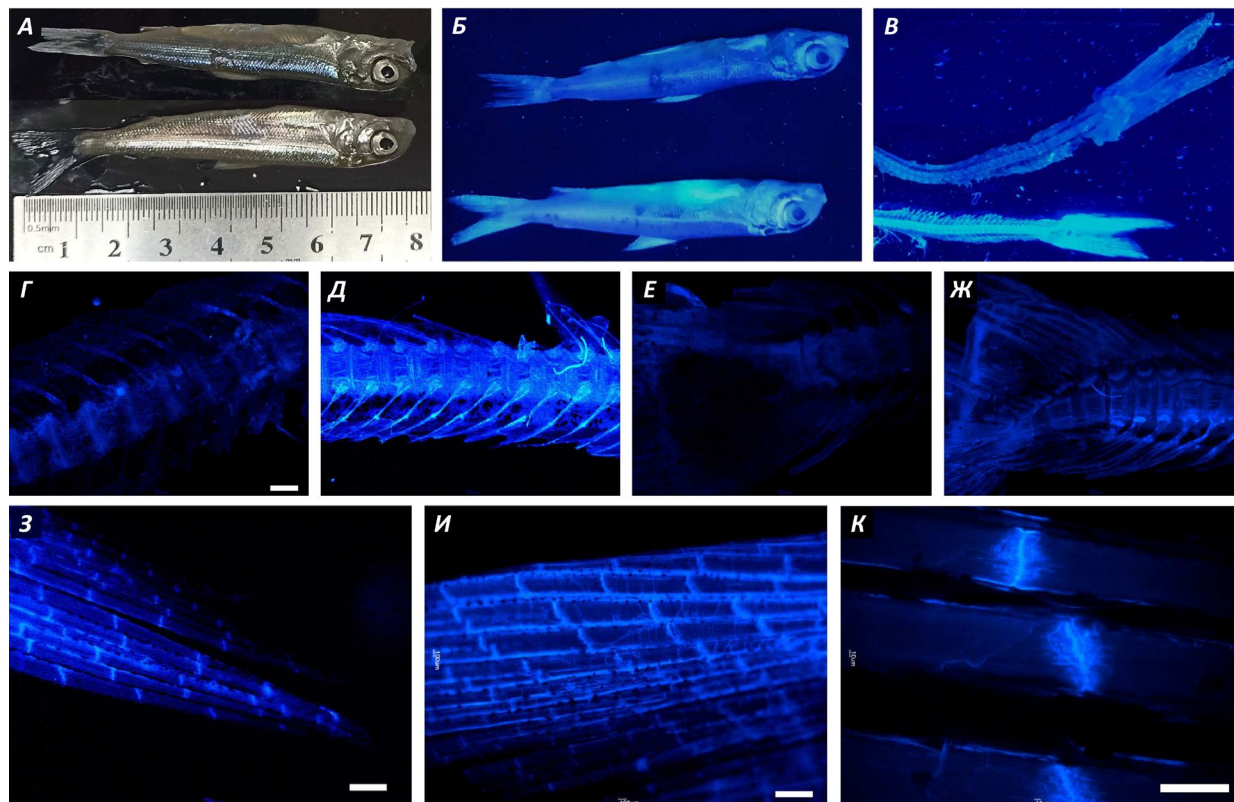


Рис.8. Фотографии рыб *C. fluviatilis* при естественном освещении (А) и при освещении светодиодами с длиной волны 365 нм (Б, В). В – скелеты рыб после механического удаления мышечных тканей. Верхнее изображение относится к экземпляру из контрольной группы, нижнее – из экспериментальной, после культивирования в течение 14 дней с кормом, модифицированным красителем QE2. Г-К – флуоресцентные микрофотографии: позвоночника (Г-Ж) и хвостового плавника (З-К) после очистки выдерживанием в воде 100°C в течение 5 минут. Г и Е – образцы контрольной группы, изображения в парах Г-Д и Е-Ж получены при одинаковых настройках видеокамеры микроскопа. Масштаб: 500 (Г-Ж и З-И) и 100 мкм (К).

Выращивание байкальских гастропод *B. baicalensis* в среде с добавлением 1 μM QE2 (Рис. 7) привело к появлению характерной синей флуоресценции раковины со стороны устья, где происходит её рост. При возбуждении флуоресценции светом с длиной волны 470 нм (Рис. 6С) наблюдается красно-жёлто-зелёное свечение раковины, отмечаемое как в контрольной группе, так и при использовании красителя QA2. Данные факты указывают на необходимость использования красителей со свечением в синей области для выявления кальций-минерализующихся структур.

Содержание рыб *C. fluviatilis* в присутствии красителя QE2, добавляемого либо в корм (2 мг/г) либо в аквариум (1 μM) привело к флуоресцентному окрашиванию рыб (Рис. 8). Наблюдение цельных организмов (Рис. 8В) осложняется рассеянием света, в том числе на защитной слизи, покрывающей тела рыб. Тем не менее, можно отметить свечение хвостового плавника и позвоночника. Флуоресценция в области брюшной полости связана, вероятно, с присутствием корма, содержащего краситель. Механическое удаление мышечных тканей (Рис. 8В) позволяет более наглядно увидеть окраску позвоночника и плавника. Микрофотографии более очищенного препарата (Рис. 8Г-Ж) также указывают на существенно более яркое свечение образцов с QE2 в сравнении с автофлуоресценцией контрольных препаратов. В случае хвостового плавника (Рис. 8З-К) окрашенными оказываются границы костных сегментов, особенно сочленения сегментов (Рис. 8К). В отличие от действия высоких концентраций кислотных красителей (Lü et al., 2019) неспецифического окрашивания сформировавшихся ранее костных сегментов не происходит. Введение красителя в аквариальную воду привело к аналогичным результатам при существенно большем расходе реагента (2,02 мг на одну рыбу в день в сравнении с 0,25 мг в случае добавления QE2 в корм).

4. Выводы

Разработан эффективный метод синтеза нового флуоресцентного красителя QE2, содержащего слабоосновную аминогруппу и две карбоксильные группы в форме метиловых эфиров, способных к гидролизу в слабощелочной среде или под действием ферментов. Краситель способен легко проникать в живые клетки, что показано на примере культуры динофлагеллят. Культивирование организмов с кальциевыми скелетами (гастроподы, рыбы) в присутствии QE2 приводит к флуоресцентному окрашиванию зон роста (устья раковин гастропод, элементы скелета и плавников рыб). Флуоресценция QE2 и продукта его гидролиза QA2 (Zelinskiy et al., 2023) существенно зависит от полярности среды, усиливаясь в неполярном окружении с одновременным смещением испускания из зелёно-голубой в синюю область.

Таким образом, краситель QE2 может найти применение для отслеживания зон кальциевой минерализации, оценки полярности клеточных

органелл, введения меток в рыбы для экспериментов в области экологии и аквакультур, окрашивания клеточных культур и скелетных элементов для исследования методом конфокальной микроскопии.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9. Авторы выражают благодарность А. П. Федотову и И. В. Ханаеву за предоставленные образцы гастропод, а также ЦКП «Ультрамикроанализ» и УНУ «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» (ЛИН СО РАН) за предоставленное оборудование.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407: 44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160: 336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Berthelot T., Talbot J.C., Lähn G. et al. 2005. Synthesis of Ne-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and Ne-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science* 11: 153–160. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)
- Davis R.P., Honeyfield D.C. 2020. Efficacy and practical limitations of calcein as a marking agent in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to sunlight and frozen sample storage. *Fisheries Research* 232: 105736. DOI: [10.1016/j.fishres.2020.105736](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105736)
- Delvene G., Lozano R.P., Piñuela L. et al. 2022. Autofluorescence of microborings in fossil freshwater bivalve shells. *Lethaia* 55(4): 1–12. DOI: [10.18261/let.55.4.7](https://doi.org/10.18261/let.55.4.7)
- Donaldson L. 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25: 2393. DOI: [10.3390/molecules25102393](https://doi.org/10.3390/molecules25102393)
- Gao J., Xie X., Liu X.-F. et al. 2024. Efficacy of calcein as a chemical marker of *Potamocorbula laevis*. *Frontiers in Marine Science* 11: 1379571. DOI: [10.3389/fmars.2024.1379571](https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1379571)
- González-Pabón M.A., Tortolero-Langarica J.J.A., Calderon-Aguilera L.E. et al. 2021. Low calcification rate, structural complexity, and calcium carbonate production of *Pocillopora* corals in a biosphere reserve of the central Mexican Pacific. *Marine Ecology* 42: e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239. DOI: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)
- Kucki M., Fuhrmann-Lieker T. 2012. Staining diatoms with rhodamine dyes: control of emission colour in photonic biocomposites. *Journal of the Royal Society Interface* 9: 727–733. DOI: [10.1098/rsif.2011.0424](https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0424)
- Levitus M. 2020. Tutorial: measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum

yields of transparent samples. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3): 033001. DOI: [10.1088/2050-6120/ab7e10](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10)

Lü H., Fu M., Zhang Z. et al. 2019. Marking fish with fluorochrome dyes. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 28: 117–135. DOI: [10.1080/23308249.2019.1681358](https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1681358)

Mohler J.W. 2003. Producing fluorescent marks on atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction. *North American Journal of Fisheries Management* 23: 1108–1113. DOI: [10.1577/M02-143](https://doi.org/10.1577/M02-143)

Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P. et al. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304: 297–300. DOI: [10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)

Prentice J.A., J. Schlechte W., Betsill R.K. 2006. Longevity of oxytetracycline and calcein in double-marked batches of fry and fingerling largemouth bass. *Proceedings of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* 60: 174–179.

Ramesh K., Hu M.Y., Thomsen J. et al. 2017. Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nature Communications* 8: 1709. DOI: [10.1038/s41467-017-01806-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01806-8)

Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent staining of living plant cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M. et al. (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols*. Cham, pp.153–165. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)

Shimizu K., Del Amo Y., Brzezinski M.A. et al. 2001. A novel fluorescent silica tracer for biological silification studies. *Chemistry and Biology* 8: 1051–1060. DOI: [10.1016/s1074-5521\(01\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00072-2)

Spires J.E., North E.W. 2022. Marking the shells of juvenile and adult eastern oysters, *Crassostrea virginica*, with the fluorochrome dye calcein and measuring growth and mortality after marking. *Journal of Molluscan Studies* 88: eyac004. DOI: [10.1093/mollus/eyac004](https://doi.org/10.1093/mollus/eyac004)

Sundström A.M., Kremp A., Daugbjerg N. et al. 2009. *Gymnodinium corollarium* sp. nov. (dinophyceae)—a new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation events in the Baltic sea. *Journal of Phycology* 45: 938–952. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00712.x)

Sviben S., Gal A., Hood M.A. et al. 2016. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga. *Nature Communications* 216(7): 11228. DOI: [10.1038/ncomms11228](https://doi.org/10.1038/ncomms11228)

Tang Y.Z., Dobbs F.C. 2007. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7): 2306–2313. DOI: [10.1128/AEM.01741-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01741-06)

Thangavelu B., Mutthamsetty V., Wang Q. et al. 2017. Design and optimization of aspartate N-acetyltransferase inhibitors for the potential treatment of Canavan disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25: 870–885. DOI: [10.1016/j.bmc.2016.11.060](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.060)

Tsien R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290(5806): 527–528. DOI: [10.1038/290527a0](https://doi.org/10.1038/290527a0)

Vidavsky N., Masic A., Schertel A. et al. 2015. Mineral-bearing vesicle transport in sea urchin embryos. *Journal of Structural Biology* 192(3): 358–365. DOI: [10.1016/j.jsb.2015.09.017](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.09.017)

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S. et al. 2023. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 244–252. DOI: [10.31951/2658-3518-2](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2)