

# Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

www.limnolwbiol.com

Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Strelova M.S., Pal'shin V.A., Annenkov V.V.\*

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

**ABSTRACT.** Vital fluorescence staining of calcium-containing structures in calcifying organisms is a powerful tool for the study of biocalcification. The main dyes used in this field have green or red fluorescence, which may be overlapped with the fluorescence of chlorophyll and other organic substances. We synthesized a novel coumarin-based fluorescent dye QA2 that stains calcium carbonate and calcium phosphate. The fluorescence of this dye depends from environment, it is enhanced in non-polar medium with a shift of the emission maximum to the blue spectrum region. Small vaterite and calcium phosphate particles adsorb QA2 on the surface and exhibit predominantly green fluorescence, while low surface area calcite crystals are stained in bulk and show additional intense blue fluorescence. The ability of the QA2 dye to generate blue fluorescence of calcium carbonate may be useful for tracking calcium carbonate formation at living organisms in the presence of green and red fluorescent organic substances.

**Keywords:** fluorescence, vital dye, coumarin, calcite, vaterite

## 1. Introduction

Vital fluorescence staining of calcium-containing structures in calcifying organisms allows us to measure their growth rates and study biocalcification processes (Ramesh et al., 2017; Tambutte et al., 2012). Various fluorescent dyes that fluoresce in the green and red spectrum are used for this purpose (Liao et al., 2021; Tada et al., 2014). Calcein (Mount et al., 2004; Vidavsky et al., 2015) and alizarin red (González-Pabón et al., 2021; Wannakajeeipiboon et al., 2023) have found the greatest use among such dyes. Calcein is considered more reliable and widely used due to its potential non-toxicity and ease of use in contrast to alizarin red, thus calcein can be added directly to the environment of organisms (Serguenco et al., 2018). However, the presence of autofluorescence in mollusk shells (Delvene et al., 2022; Spires et al., 2021) as well as in algae (Donaldson, 2020; Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007) can cause difficulties for the interpretation of fluorescence images because there is an overlap fluorescence spectra of calcein or alizarin red with the structures autofluorescing in the yellow-green or red region. Using dyes with fluorescence in the blue region of the spectrum can be the solution for this problem. We recently developed dye QN2 based on coumarin to stain growing siliceous frustules of

diatom algae (Annenkov et al., 2019). This dye exhibits emission in the blue range of the spectrum with the addition of green fluorescence upon incorporation into silica. The ability of QN2 to enter siliceous structures is attributed the presence of amine groups capable interacting with silica. Calcium-based biominerals are bound to carboxyl-containing substances (Nudelman et al., 2006; Rao et al., 2015), so calcium-targeted dyes (alizarin red and calcein) contain several acidic groups.

The aim of this work is to synthesize a new coumarin dye QA2 with two carboxyl groups, to study its spectral properties and ability to stain *in situ* obtained calcium carbonate and phosphate.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical reagents

All solvents and reagents were purchased from Vekton JSC (St. Petersburg, Russia). Ethyl acetate was washed with a sodium bicarbonate solution, distilled water, dried over anhydrous calcium chloride followed by distillation. Dimethylformamide (DMF) was shaken for 30 minutes with anhydrous  $\text{CuSO}_4$ , filtered through a Büchner funnel, distilled in vacuum and kept with 3A molecular sieves. Triethylamine was dried with  $\text{CaH}_2$  and distilled. L-aspartic acid was kept over  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  in an evacuated desiccator for 48 hours before

\*Corresponding author.

E-mail address: [annenkov@lin.irk.ru](mailto:annenkov@lin.irk.ru), [annenkov@yahoo.com](mailto:annenkov@yahoo.com) (V.V. Annenkov)

**Received:** December 03, 2023; **Accepted:** December 18, 2023;

**Available online:** December 20, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



use. 7-(Diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid and succinimidyl ester of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid were synthesized according to (Berthelot et al., 2005).

## 2.2. Synthesis of N-[[7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-yl]carbonyl]-L-aspartic acid (QA2)

Mixture of 40.6 mg (0.305 mmole) of L-aspartic acid, 74.8 mg (0.739 mmole) of triethylamine, 90.3 mg (0.252 mmole) of succinimidyl ester of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid and 3 mL of dry DMF was magnetically stirred under nitrogen atmosphere at room temperature for four hours and at 55°C for five hours. Then the volatiles were evaporated in vacuum of an oil rotary vane pump (35°C heating bath) and the residue was taken up in a mixture of 3 mL of distilled water and 5 mL of ethyl acetate followed by filtration through a cotton plug. The aqueous layer was separated, extracted with ethyl acetate (2 mL × 2), acidified with concentrated hydrochloric acid and extracted again with ethyl acetate (2 mL × 3). The latter combined ethyl acetate extracts were dried over MgSO<sub>4</sub>, rotary evaporated and kept in vacuum of an oil rotary vane pump at 40°C for three hours to give a yellow-brown product. ESI-MS, found: [M+H]<sup>+</sup> 377.1340, molecular formula C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, requires [M+H]<sup>+</sup> 377.1343.

## 2.3. Synthesis of calcium carbonate and calcium phosphate in the presence of dyes

Stained calcium carbonate precipitates were obtained by coprecipitation using stock solutions of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (24 mM, pH = 9), CaCl<sub>2</sub> (24 mM) and QA2 (4 mM). The precipitates were formed in 10 ml glass vials at 25°C. Total solution volume was 4 ml. Solutions of sodium carbonate, dye and the required amount of water were mixed, shaken well and after 1 min, calcium chloride solution was added, while stirring. Concentrations in the final mixture were 6 mM for Ca<sup>2+</sup>, 6 mM for CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, 0.01 mM for dye. The vial was capped and left at room temperature. The precipitate that formed after 2 h was separated by centrifugation (1000 g, 10 min), washed with water (4°C) and studied with microscopy.

Stained calcium phosphate precipitates were obtained by coprecipitation using stock solutions of

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (24 mmol, pH = 10) and CaCl<sub>2</sub> (24 mmol) and QA2 (4 mM). The precipitates were generally formed in 10 ml glass vials at 25°C. Total solution volume was 4 ml. Solutions of diammonium hydrogen phosphate, dye and the required amount of water were mixed, shaken well and after 1 min, calcium chloride solution was added, while stirring. Concentrations in the final mixture were 6 mM for Ca<sup>2+</sup>, 3.6 mM for HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 0.01 mM for dye. The vial was capped and left at room temperature. The precipitate that formed after 2 h was separated by centrifugation (1000 g, 10 min), washed with water (4°C) and studied with microscopy.

## 2.4. Instrumentation

HRMS analysis was performed on an Agilent 6210 TOF (time-of-flight) LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) System. Sample was dissolved in a mixture of deionized water and acetonitrile (2/1 (v/v)). Water and acetonitrile with 0.1% (v/v) heptafluorobutyric acid were used as eluting solvents A and B, respectively. The conditions for TOF MS were as follows: the mass range was m/z 60 to 500, and scan time was 1 s with an interscan delay of 0.1 s; mass spectra were recorded under electrospray ionization (ESI)<sup>+</sup>, V mode, centroid, normal dynamic range, capillary voltage 3500 V, desolvation temperature 325 °C, and nitrogen flow 5 L/min.

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.

Light and fluorescent microscopy was performed with MOTIC AE-31T inverted microscope with a HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for green and yellow emission and 365 nm for blue emission.

## 3. Results and discussion

QA2 dye was prepared by the reaction of succinimidyl ester of 7-(diethylamino) coumarin-3-carboxylic acid with L-aspartic acid (Fig. 1). Absorbance spectra of the new dye (Fig. 2) contain three peaks at 216, 265 and 430 (water), 253 and 410 (dioxane) nm. The shape of the emission spectra (Fig. 3) does not strongly depend on the excitation wavelength, but the

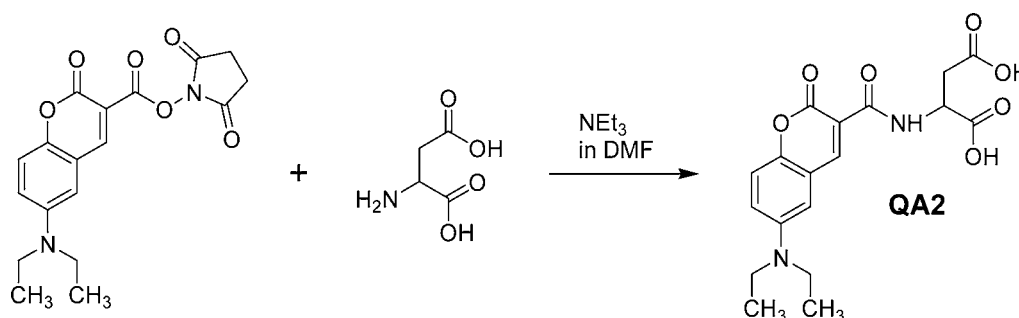


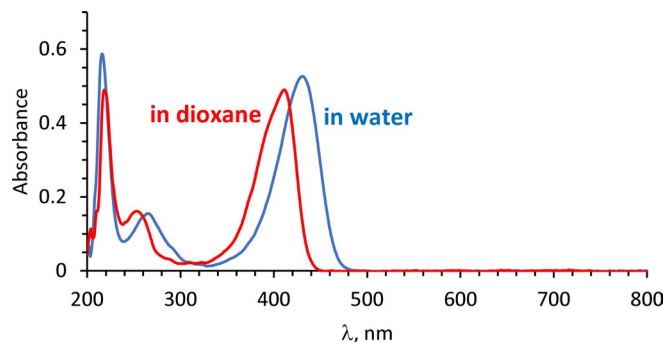
Fig.1. Synthesis of QA2 dye.

fluorescence intensity in water is much lower than in dioxane, and its maximum (475 nm) is shifted to red compared to the fluorescence in dioxane (455 nm). Similar effects were observed and discussed for the dye QN2 (Annenkov et al., 2019).

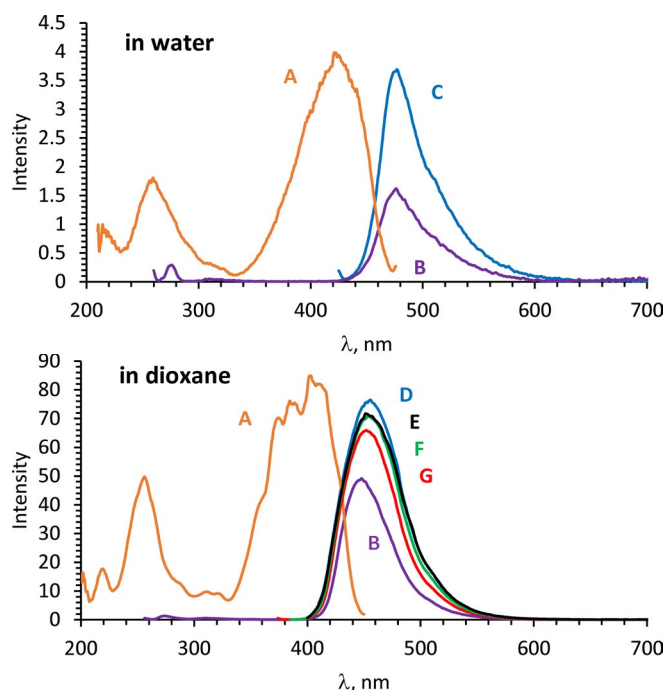
Calcium carbonate obtained from the reaction of calcium chloride and sodium carbonate (Fig. 4) is characterized by particles of two forms: cubic crystals and aggregated small rounded particles. The cubic crystals and aggregates were calcite and vaterite, respectively. Vaterite is metastable form of calcium carbonate which transforms into calcite in aqueous media by dissolving and recrystallization (Ogino et al., 1987). Calcite particles show green and blue fluorescence, while vaterite shows only green-yellow emission. This difference in fluorescence color is similar to the difference in emission spectra of QA2 in water and in a nonpolar solvent such as dioxane. We hypothesize that small vaterite particles with high surface area adsorb QA2 on the surface and the fluorescence of the dye is similar to that in aqueous medium. The dye is incorporated into calcite crystals at the transformation of vaterite in calcite, as result its fluorescence becomes similar to emission in a non-aqueous medium, with a shift to the blue range. Precipitation of calcium phosphate in the presence of QA2 dye results in the formation of small green-fluorescent particles with weak blue emission (Fig. 5). Probably the dye in small calcium phosphate particles is not as isolated from water as in calcite crystals, which reduces fluorescence in the blue range.

#### 4. Conclusions

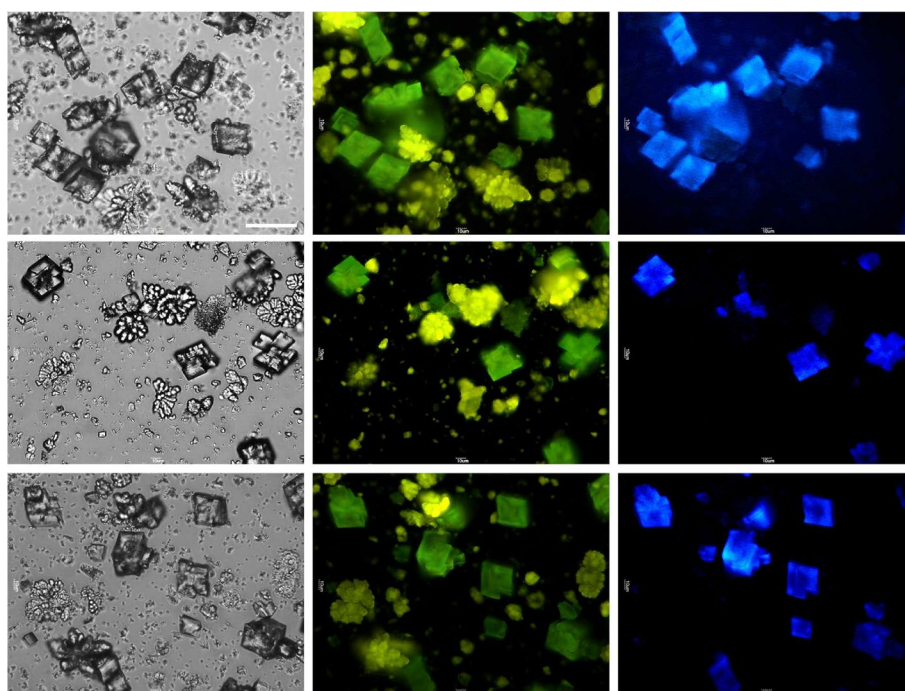
We synthesized a novel coumarin-based fluorescent dye QA2 that stains calcium carbonate and calcium phosphate. The fluorescence of the dye depends on the environment, it is enhanced in non-



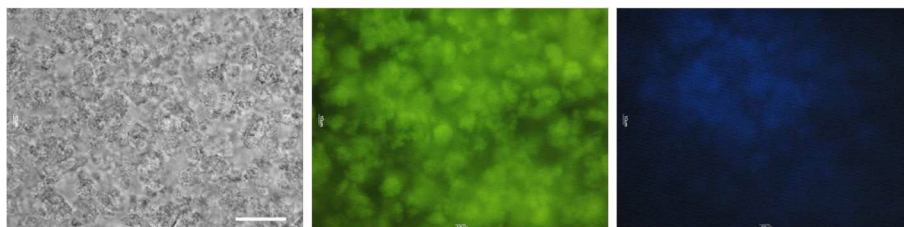
**Fig.2.** Absorbance spectra of 10  $\mu\text{M}$  QA2 solutions in water and 1,4-dioxane.



**Fig.3.** Excitation and emission spectra of QA2 in water and 1,4-dioxane. Concentration 5  $\mu\text{M}$ . A – excitation spectra at emission 452 nm, B – emission spectra at excitation 256 nm, C – 425 nm, D – 410 nm, E – 400 nm, F – 385 nm, G – 374 nm. Emission and excitation slits 5 nm.



**Fig.4.** Visible light microphotographs and epifluorescence of calcium carbonate particles obtained in the presence of dye QA2. Scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig.5.** Visible light microphotographs and epifluorescence of calcium phosphate particles obtained in the presence of QA2 dye. Scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ .

polar medium and the emission maximum shifts to the blue region of the spectrum. Small vaterite and calcium phosphate particles adsorb QA2 on the surface and exhibit predominantly green fluorescence, while low surface area calcite crystals are stained in bulk and show also intense blue fluorescence. The ability of the QA2 dye to generate blue fluorescence of calcium carbonate may be useful for tracking calcium carbonate formation in living organisms in the presence of green and red fluorescent organic substances.

## Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project # 122012600070-9. The authors wish to thank the Center of Ultramicroanalysis (Limnological Institute) for providing equipment.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- 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., Laiñ G. et al. 2005. Synthesis of *N*ε-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and *N*ε-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science* 11:153–60. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)
- 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)
- 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(6):e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)
- Liao J., Patel D., Zhao Q. et al. 2021. A novel  $\text{Ca}^{2+}$  indicator for long-term tracking of intracellular calcium flux. *Biotechniques*. 70(5):271-277. DOI: [10.2144/btn-2020-0161](https://doi.org/10.2144/btn-2020-0161).
- Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P. et al. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. *Science* 304:297. DOI: [10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)
- Nudelman F., Gotliv B.A., Addadi L. et al. 2006. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre.

*Journal of Structural Biology* 153:176–187. DOI: [10.1016/j.jsb.2005.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.09.009)

Ogino T., Suzuki T., Sawada K. 1987. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51(10):2757–2767. DOI: [10.1016/0016-7037\(87\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90155-4)

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)

Rao A., Fernández M.S., Cölfen H. et al. 2015. Distinct effects of avian egg derived anionic proteoglycans on the early stages of calcium carbonate mineralization. *Crystal Growth & Design* 15:2052 – 2056. DOI: [10.1021/acs.cgd.5b00342](https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00342)

Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent Staining of Living Plant Cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M., Huang B. (Eds) *Plant Microtechniques and Protocols*. Springer, Cham. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)

Serguienko A., Wan M.Y., Myklebost O. 2018. Real-time vital mineralization detection and quantification during in vitro osteoblast differentiation. *Biological Procedures Online* 20:14. DOI: [10.1186/s12575-018-0079-4](https://doi.org/10.1186/s12575-018-0079-4)

Spires J.E., Dungan C.F., North E.W. 2021. Marking the shells of pediveliger eastern oysters *Crassostrea virginica*, with a calcein fluorochrome dye. *Journal of Shellfish Research* 40(3):479–487. DOI: [10.2983/035.040.0304](https://doi.org/10.2983/035.040.0304)

Tada M., Takeuchi A., Hashizume M. et al. 2014. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo. *European Journal of Neuroscience* 39(11):1720-8. DOI: [10.1111/ejn.12476](https://doi.org/10.1111/ejn.12476)

Tambutte E., Tambutte S., Segonds N. et al. 2012. Calcein labelling and electrophysiology: insights on coral tissue permeability and calcification. *Proceedings of the Royal Society* 279:19–27. DOI: [10.1098/rspb.2011.0733](https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0733)

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)

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

Wannakajeepiboon M., Sathorn C., Kornsutthisopon C. et al. 2023. Evaluation of the chemical, physical, and biological properties of a newly developed bioceramic cement derived from cockle shells: an in vitro study. *BMC Oral Health* 23:354. DOI: [10.1186/s12903-023-03073-0](https://doi.org/10.1186/s12903-023-03073-0)

# Кислотный краситель на основе кумарина для флуоресцентного окрашивания частиц карбоната кальция

Зелинский С.Н., Даниловцева Е.Н., Стрелова М.С., Пальшин В.А., Анненков В.В.\*

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

**АННОТАЦИЯ.** Витальное флуоресцентное окрашивание кальцийсодержащих структур в кальцифицирующих организмах - мощный инструмент для изучения биокальцификации. Основные красители, используемые в этой области, обладают зеленой или красной флуоресценцией, которая может перекрываться с флуоресценцией хлорофилла и других органических веществ. Мы синтезировали новый флуоресцентный краситель QA2 на основе кумарина, который окрашивает карбонат и фосфат кальция. Флуоресценция красителя зависит от среды, она усиливается в неполярной среде, а максимум эмиссии смещается в синюю область спектра. Мелкие частицы ватерита и фосфата кальция адсорбируют QA2 на поверхности и демонстрируют преимущественно зеленую флуоресценцию, в то время как кристаллы кальцита с низкой площадью поверхности окрашиваются в массе и демонстрируют также интенсивную синюю флуоресценцию. Способность красителя QA2 генерировать синюю флуоресценцию карбоната кальция может быть полезна для отслеживания образования карбоната кальция в живых организмах в присутствии органических веществ с зеленой и красной флуоресценцией.

**Ключевые слова:** флуоресценция, витальный краситель, кумарин, кальцит, ватерит

## 1. Введение

Витальное флуоресцентное окрашивание кальцийсодержащих структур в кальцифицирующих организмах позволяет измерять скорость их роста и изучать процессы биокальцификации (Ramesh et al., 2017; Tambutte et al., 2012). Для этого используются различные флуоресцентные красители, флуоресцирующие в зеленом и красном спектре (Liao et al., 2021; Tada et al., 2014). Наибольшее применение среди таких красителей нашли кальцеин (Mount et al., 2004; Vidavsky et al., 2015) и ализариновый красный (González-Pabón et al., 2021; Wannakaeriboon et al., 2023). Кальцеин считается более надежным и широко используемым благодаря своей потенциальной нетоксичности и простоте применения - в отличие от ализаринового красного, кальцеин можно добавлять непосредственно в среду обитания организмов (Serguienko et al., 2018). Однако наличие автофлуоресценции в раковинах моллюсков (Delvene et al., 2022; Spires et al., 2021), а также в водорослях (Donaldson, 2020; Schoor et al., 2015; Tang and Dobbs, 2007) может вызвать трудности в интерпретации флуоресцентных изображений из-за перекрытия спектров флуорес-

ценции кальцеина или ализаринового красного и структур, автофлуоресцирующих в желто-зеленой или красной области. Решением проблемы может стать использование красителей с флуоресценцией в синей области спектра. Недавно (Annenkov et al., 2019) мы разработали краситель QN2 на основе кумарина для окрашивания растущих кремнистых фрустул диатомовых водорослей. Этот краситель демонстрирует эмиссию в синей области спектра с добавлением зеленой флуоресценции при встраивании в кремнезем. Способность QN2 проникать в кремнистые структуры объясняется наличием аминных групп, способных взаимодействовать с кремнеземом. Биоминералы на основе кальция способны связываться с карбоксилсодержащими веществами (Nudelman et al., 2006; Rao et al., 2015), поэтому красители, нацеленные на кальций (ализариновый красный и кальцеин), содержат несколько кислотных групп.

Цель данной работы - синтез нового кумаринового красителя QA2 с двумя карбоксильными группами, изучение его спектральных свойств и способности окрашивать *in situ* полученные карбонат и фосфат кальция.

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [annenkov@lin.irk.ru](mailto:annenkov@lin.irk.ru), [annenkov@yahoo.com](mailto:annenkov@yahoo.com) (В.В. Анненков)



## 2. Материалы и методы

### 2.1. Химические реактивы

Все растворители и реактивы были приобретены в ЗАО «Вектон» (Санкт-Петербург, Россия). Этилацетат промывали раствором бикарбоната натрия, дистиллированной водой, сушили над безводным хлоридом кальция с последующей отгонкой. Диметилформамид (ДМФА) встряхивали в течение 30 минут с безводным  $\text{CuSO}_4$ , фильтровали через воронку Бюхнера, перегоняли в вакууме и выдерживали на молекулярных ситах 3А. Триэтиламин сушили  $\text{CaH}_2$  и отгоняли. Перед использованием L-аспарагиновую кислоту выдерживали над  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  в вакуумированном эксикаторе в течение 48 часов. 7-(Диэтиламино)кумарин-3-карбоновая кислота и сукцинимидиловый эфир 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты были синтезированы в соответствии с (Berthelot et al., 2005).

### 2.2. Синтез of N-[[7-(диэтиламино)-2-оксо-2Н-1-бензопиран-3-ил]карбонил]-L-аспарагиновой кислоты (QA2)

Смесь 40.6 мг (0.305 ммоль) L-аспарагиновой кислоты, 74.8 мг (0.739 ммоль) триэтиламина, 90.3 мг (0.252 ммоль) сукцинимидилового эфира 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты и 3 мл сухого ДМФА перемешивали на магнитной мешалке в атмосфере азота при комнатной температуре в течение четырёх часов и при 55°C пять часов. Затем летучие компоненты выпарили в вакууме масляного насоса (нагрев на бане 35°C), а остаток растворили в смеси 3 мл дистиллированной воды и 5 мл этилацетата и профильтровали через слой ваты. Водный слой отделили, проэкстрагировали этилацетатом (2 мл × 2), подкислили концентрированной соляной кислотой и снова проэкстрагировали этилацетатом (2 мл × 3). Последние объединенные этилацетатные экстракты высушили  $\text{MgSO}_4$ , выпарили на ротаторном испарителе и выдержали в вакууме масляного насоса при 40°C в течение трех часов, получив желто-коричневый продукт. ESI-MS, найдено:  $[\text{M} + \text{H}]^+$  377.1340, молекулярной формуле  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$  соответствует  $[\text{M} + \text{H}]^+$  377.1343.

### 2.3. Синтез карбоната и фосфата кальция в присутствии красителей

Окрашенные осадки карбоната кальция получали соосаждением из исходных растворов  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (24 mM, pH = 9),  $\text{CaCl}_2$  (24 mM) и QA2 (4 mM). Осадки получали в стеклянных флаконах емкостью 10 мл при 25°C. Общий объем раствора составлял 4 мл. Растворы карбоната натрия, красителя и необходимого количества воды смешивали, хорошо встряхивали и через 1 минуту при перемешивании добавляли раствор хлорида кальция. Концентрации в конечной смеси составили 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 6 mM  $\text{CO}_3^{2-}$ , 0,01 mM красителя. Флакон закрывали крышкой и оставляли при комнатной температуре. Выпавший

через 2 ч осадок отделяли центрифугированием (1000 g, 10 минут), промывали водой (4°C) и исследовали микроскопически.

Окрашенные осадки фосфата кальция получали соосаждением из маточных растворов  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (24 ммоль, pH = 10),  $\text{CaCl}_2$  (24 ммоль) и QA2 (4 mM). Осадки получали в стеклянных флаконах емкостью 10 мл при 25°C. Общий объем раствора составлял 4 мл. Растворы гидрофосфата диаммония, красителя и необходимого количества воды смешивали, хорошо встряхивали и через 1 мин при перемешивании добавляли раствор хлорида кальция. Концентрации в конечной смеси составляли 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 3,6 mM  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 0,01 mM красителя. Флакон закрывали крышкой и оставляли при комнатной температуре. Выпавший через 2 ч осадок отделяли центрифугированием (1000 g, 10 минут), промывали водой (4°C) и исследовали микроскопически.

### 2.4. Приборы

Анализ HRMS проводили при помощи системы Agilent 6210 TOF (времяпролетная) LC/MS (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия). Образец растворяли в смеси деионизированной воды и ацетонитрила 2/1 (по объему). В качестве элюирующих растворителей А и В использовали воду и ацетонитрил с 0,1% добавкой (по объему) гептафтормасляной кислоты. Условия проведения TOF MS были следующими: диапазон масс m/z от 60 до 500, время сканирования 1 секунда с задержкой между сканированиями 0,1 с; масс-спектры записывали при ионизации электрораспылением (ESI)+, режим V, центрион, нормальный динамический диапазон, капиллярное напряжение 3500 В, температура десольватации 325 °C и поток азота 5 л/мин.

Спектры поглощения, возбуждения и эмиссии измеряли на спектрофлуориметре CM-2203 (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры - современные разработки», республика Беларусь, Минск) в 10 мм кварцевой кювете. В качестве источника возбуждения в приборе использовалась импульсная ксеноновая лампа.

Световая и флуоресцентная микроскопия проводилась на инвертированном микроскопе MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM. Возбуждение проводилось при 470 нм для зеленой и желтой эмиссии и 365 нм для синей эмиссии.

## 3. Результаты и обсуждение

Краситель QA2 был получен в реакции сукцинимидилового эфира 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоновой кислоты с L-аспарагиновой кислотой (Рис. 1). Спектры поглощения нового красителя (Рис. 2) содержат три пика при 216, 265 и 430 (вода), 253 и 410 (диоксан) нм. Форма спектров эмиссии (Рис. 3) не сильно зависит от длины волны возбуждения, но интенсивность флуорес-

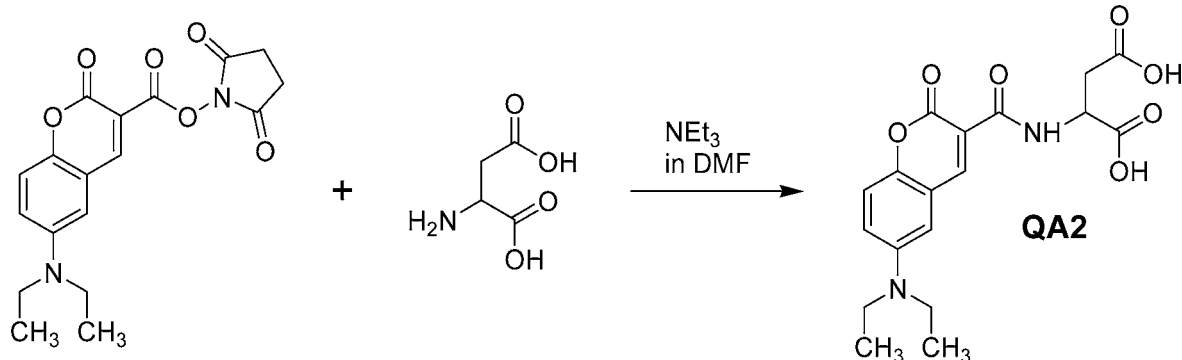


Рис.1. Синтез красителя QA2.

ценции в воде значительно ниже, чем в диоксане, а ее максимум (475 нм) сдвинут в красную область по сравнению с флуоресценцией в диоксане (455 нм). Аналогичные эффекты наблюдались и обсуждались для красителя QN2 (Annenkov et al., 2019).

Карбонат кальция, получаемый в результате реакции хлорида кальция и карбоната натрия (Рис. 4), содержит частицы двух форм: кубические кристаллы и агрегированные мелкие округлые частицы. Кубические кристаллы представляют собой кальцит, а мелкие частицы - ватерит - метастабильную форму карбоната кальция, которая в водной среде превращается в кальцит путем растворения и перекристаллизации (Ogino et al., 1987). Частицы кальцита проявляют зеленую и синюю флуоресценцию, в то время как ватерит демонстрирует только зелено-желтую эмиссию. Это различие в цвете флуоресценции аналогично различию в спектрах эмиссии в воде и в неполярном растворителе, таком как диоксан. Мы предполагаем, что мелкие частицы ватерита с высокой площадью поверхности адсорбируют QA2 на поверхности, и флуоресценция красителя аналогична флуоресценции в водной среде. Превращение ватерита в кальцит приводит к захоронению красителя в кристалле кальцита, и его флуоресценция становится похожей на эмиссию в неводной среде, со сдвигом в синий диапазон. Осаждение фосфата кальция в присутствии красителя QA2 приводит к образованию мелких зелено-флуоресцирующих частиц, которые демонстрируют слабую синюю эмиссию (Рис. 5). Вероятно, краситель в мелких частицах фосфата кальция не так изолирован от воды, как в кристаллах кальцита, что снижает флуоресценцию в синем диапазоне.

#### 4. Выводы

Мы синтезировали новый флуоресцентный краситель QA2 на основе кумарина, который окрашивает карбонат и фосфат кальция. Флуоресценция красителя зависит от среды, она усиливается в неполярной среде, а максимум эмиссии смещается в синюю область спектра. Мелкие частицы ватерита и фосфата кальция адсорбируют QA2 на поверхности и демонстрируют преимущественно зеленую флуоресценцию, в то время как кристаллы кальцита с низкой площадью поверхности окрашиваются в массу и демонстрируют также интенсивную синюю

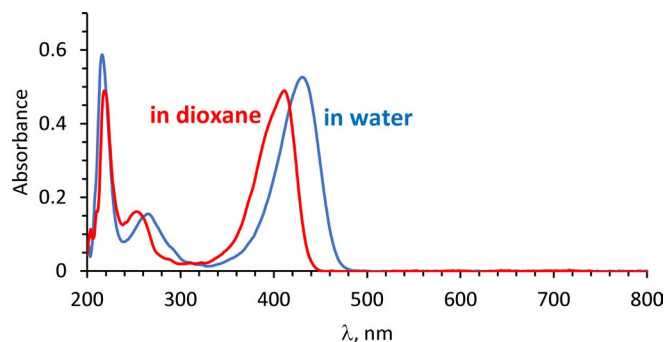


Рис.2. Спектры поглощения 10 мМ растворов QA2 в воде и 1,4-диоксане.

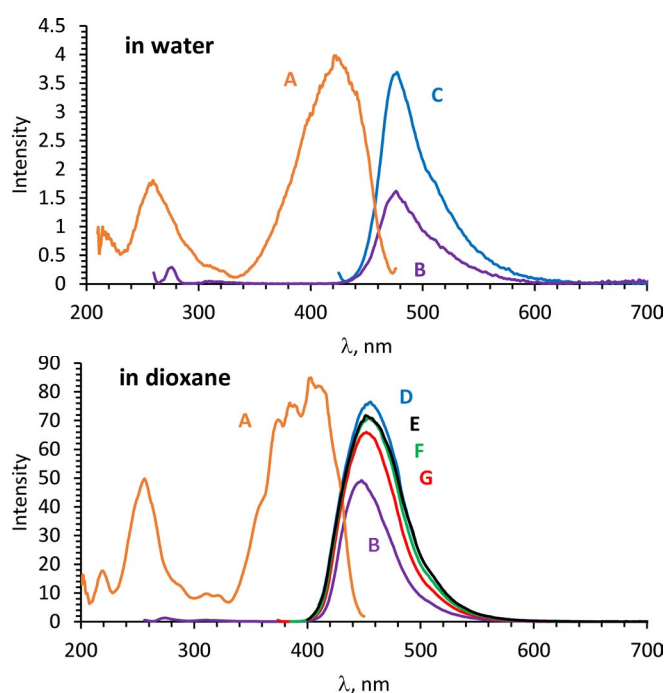
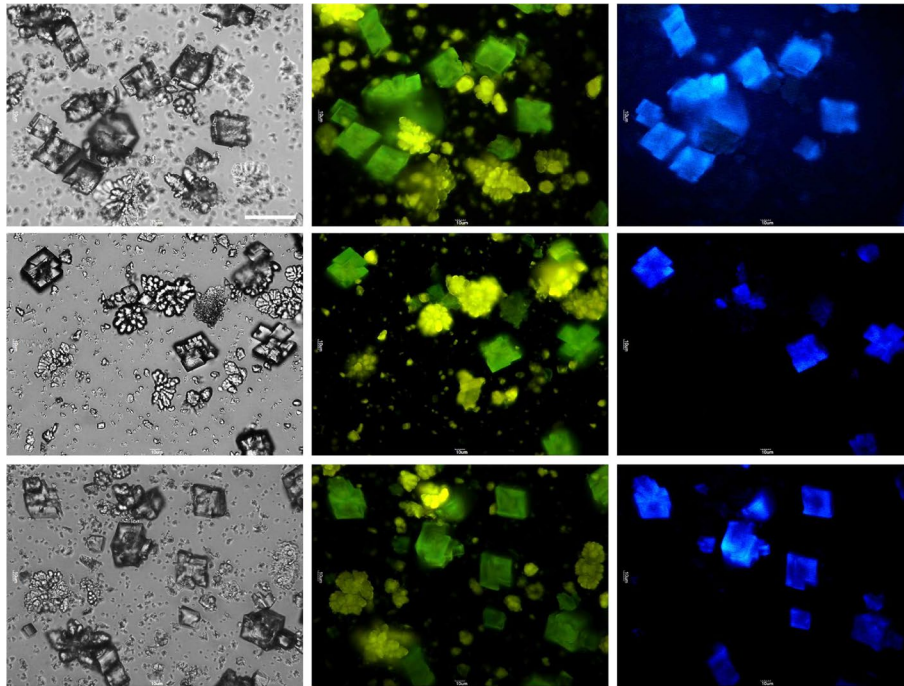
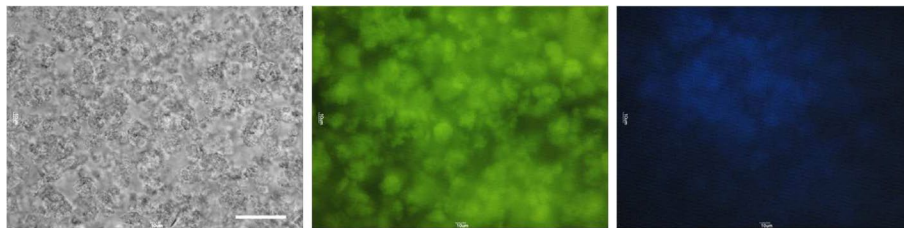


Рис.3. Спектры возбуждения и эмиссии QA2 в воде и 1,4-диоксане. Концентрация 5 мМ. А - спектры возбуждения при эмиссии 452 нм, В - спектры эмиссии при возбуждении 256 нм, С - 425 нм, D - 410 нм, Е - 400 нм, F - 385 нм, G - 374 нм. Щели для эмиссии и возбуждения 5 нм



**Рис.4.** Микрофотографии в видимом свете и эпифлуоресценция частиц карбоната кальция, полученных в присутствии красителя QA2. Масштабная линейка 50 µм.



**Рис.5.** Микрофотографии в видимом свете и эпифлуоресценция частиц фосфата кальция, полученных в присутствии красителя QA2. Масштабная линейка 50 µм.

флуоресценцию. Способность красителя QA2 генерировать синюю флуоресценцию карбоната кальция может быть полезна для отслеживания образования карбоната кальция в живых организмах в присутствии органических веществ с зеленой и красной флуоресценцией.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9. Авторы выражают благодарность Центру ультрамикрoанализа (Лимнологический институт) за предоставленное оборудование.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

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 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* 11:153–60. DOI: [10.1002/psc.608](https://doi.org/10.1002/psc.608)

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)

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(6):e12678. DOI: [10.1111/maec.12678](https://doi.org/10.1111/maec.12678)

Liao J., Patel D., Zhao Q. et al. 2021. A novel Ca<sup>2+</sup> indicator for long-term tracking of intracellular calcium flux. *Biotechniques*. 70(5):271-277. DOI: [10.2144/btn-2020-0161](https://doi.org/10.2144/btn-2020-0161).

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

Nudelman F., Gotliv B.A., Addadi L. et al. 2006. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in naacre. *Journal of Structural Biology* 153:176–187. DOI: [10.1016/j.jsb.2005.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.09.009)

Ogino T., Suzuki T., Sawada K. 1987. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51(10):2757–2767. DOI: [10.1016/0016-7037\(87\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90155-4)



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)

Rao A., Fernández M.S., Cölfen H. et al. 2015. Distinct effects of avian egg derived anionic proteoglycans on the early stages of calcium carbonate mineralization. *Crystal Growth & Design* 15:2052 – 2056. DOI: [10.1021/acs.cgd.5b00342](https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00342)

Schoor S., Lung S.C., Sigurdson D. et al. 2015. Fluorescent Staining of Living Plant Cells. In: Yeung E., Stasolla C., Sumner M., Huang B. (Eds) *Plant Microtechniques and Protocols*. Springer, Cham. DOI: [10.1007/978-3-319-19944-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_9)

Serguienko A., Wan M.Y., Myklebost O. 2018. Real-time vital mineralization detection and quantification during in vitro osteoblast differentiation. *Biological Procedures Online* 20:14. DOI: [10.1186/s12575-018-0079-4](https://doi.org/10.1186/s12575-018-0079-4)

Spires J.E., Dungan C.F., North E.W. 2021. Marking the shells of pediveliger eastern oysters *Crassostrea virginica*, with a calcein fluorochrome dye. *Journal of Shellfish Research* 40(3):479–487. DOI: [10.2983/035.040.0304](https://doi.org/10.2983/035.040.0304)

Tada M., Takeuchi A., Hashizume M. et al. 2014. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging

of neural activity in vitro and in vivo. *European Journal of Neuroscience* 39(11):1720-8. DOI: [10.1111/ejn.12476](https://doi.org/10.1111/ejn.12476)

Tambutte E., Tambutte S., Segonds N. et al. 2012. Calcein labelling and electrophysiology: insights on coral tissue permeability and calcification. *Proceedings of the Royal Society* 279:19–27. DOI: [10.1098/rspb.2011.0733](https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0733)

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)

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

Wannakajeepiboon M., Sathorn C., Kornsutthisopon C. et al. 2023. Evaluation of the chemical, physical, and biological properties of a newly developed bioceramic cement derived from cockle shells: an in vitro study. *BMC Oral Health* 23:354. DOI: [10.1186/s12903-023-03073-0](https://doi.org/10.1186/s12903-023-03073-0)