

Исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК методом спектроскопии комбинационного рассеяния света

Ю. Н. Близнюк, Т. В. Большух, Е. Б. Круглова, М. А. Семенов, В. Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины
Ул. Академика Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина

bolbukh@ire.kharkov.ua

Методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света и спектрофотометрии в видимой области исследованы особенности комплексообразования бромистого этидия (ЭБ) с тимусной ДНК при высоких и низких соотношениях концентраций биополимер/лиганд (P/D). Показано, что взаимодействие ЭБ с ДНК осуществляется двумя способами: по типу интеркаляции и за счет внешнего связывания. Из анализа спектров КР комплексов следует, что аминокислоты ЭБ образуют водородные связи с атомами кислорода O4' и O5' ДНК в обоих типах комплексов. Низкая степень заполнения ДНК лигандом (P/D = 20) не изменяет В-формы ДНК, а высокая (P/D = 3) – приводит к конформационному В–А-переходу.

Ключевые слова: бромистый этидий, ДНК, комплекс, спектроскопия комбинационного рассеяния, спектрофотометрия.

Введение. Исследование механизмов взаимодействия биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами является актуальной задачей, поскольку при образовании разных типов комплексов с ДНК лиганды могут изменять конформацию и биологическую активность макромолекул.

Многие годы бромистый этидий (ЭБ) использовались как классический интеркалятор, но в последнее время теоретическими исследованиями кривых плавления комплексов ДНК–ЭБ [1], а также экспериментальным изучением кривых титрования и изотерм связывания методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии [2] показано, что помимо образования интеркаляционных комплек-

сов ДНК с ЭБ при определенных условиях возможно формирование комплексов по типу внешнего связывания.

Ранее методом ИК-спектроскопии в пленках при разных относительных влажностях установлено [3], что образование комплексов ЭБ с ДНК сопровождается уменьшением гидратации сахарофосфатного остова ДНК, а встраивание лиганда происходит в GC-сайты со стороны малой бороздки. Однако такие исследования выполнены лишь при одном соотношении концентраций ДНК и ЭБ (P/D = 4), что не позволило выявить, как будут варьироваться наблюдаемые спектральные параметры полос поглощения ДНК при изменении концентраций взаимодействующих компонентов. Кроме того, методом комбинационного рассеяния (КР)

света показано [4], что связывание ЭБ с ДНК в области низких молярных отношений концентраций ДНК–лиганд ($P/D = 6$) сопровождается В–А-конформационным переходом полинуклеотидной матрицы. И вопрос о том, насколько наблюдаемые спектральные отличия связаны с разным типом комплексов ЭБ с ДНК и насколько – с конформационными изменениями матрицы ДНК при различной степени ее заполнения лигандом, пока остается без ответа.

В настоящей работе методами спектроскопии КР света и спектрофотометрии в видимой области исследовано связывание ЭБ с тимусной ДНК при низких и высоких значениях P/D . Цель таких исследований в том, чтобы определить молекулярные механизмы связывания ЭБ с ДНК при образовании комплексов по типу интеркаляции и внешнего связывания, а также показать, что при плотном заполнении ДНК лигандом происходит структурный переход В–А.

Материалы и методы. В работе использовали бромистый этидий («Fluka», Швейцария) и ДНК тимуса телят («Serva», ФРГ) без дополнительной очистки. Все растворы готовили в стандартном фосфатном буфере ($2,5 \cdot 10^{-2}$ М KH_2PO_4 , $2,5 \cdot 10^{-2}$ М Na_2HPO_4) при рН 6,86.

Концентрации ЭБ и ДНК рассчитывали, используя молярные коэффициенты экстинкции $\epsilon_{480} = 5860 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [5] и $\epsilon_{260} = 6400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ соответственно. Комплексы ДНК–ЭБ для всех измерений готовили при разных значениях P/D (соотношение молярных концентраций ДНК и бромистого этидия), при этом концентрация лиганда оставалась неизменной ($C_{\text{ЭБ}} = 1,1 \cdot 10^{-4}$ М). Пленки ДНК получали испарением воды при $t = 4$ С из раствора полинуклеотида с $C_{\text{ДНК}} = 10^{-3}$ М. Для получения А- и В-форм ДНК в герметично закрытую кювету с пленкой ДНК помещали соответствующие растворы насыщенных солей для достижения необходимого значения относительной влажности (ОВ): NaCl – 76 % ОВ и K_2SO_4 – 96 % ОВ для А- и В-форм ДНК соответственно [6–8].

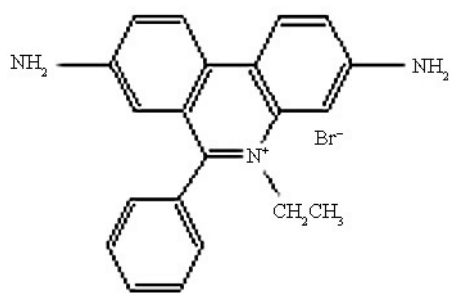
Спектрофотометрические измерения проводили в термостатированных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре Specord M 40 (ФРГ).

Спектры КР ЭБ и смесей ДНК–ЭБ записаны на спектрометре DILOR Z-16 (Франция) с двойным монохроматором. Градуировку спектрометра осуществляли по частотам спектра CCl_4 [9]. В работе использовали аргоновый лазер с линией возбуждения $\lambda = 514,5$ нм, расположенной в области полосы собственного электронного поглощения лиганда, что соответствует условиям получения предрезонансного спектра КР бромистого этидия. Растворы ЭБ и его смесей с ДНК, а также пленки ДНК помещали в квадратные кварцевые кюветы (10 мм) и герметизировали. Мощность лазерного излучения не превышала 25 мВт, что не вызывает фото- и теплоразрушения образцов. Спектральная ширина щели составляла $4,5 \text{ cm}^{-1}$, скорость сканирования – $30 \text{ cm}^{-1}/\text{мин}$. Точность воспроизведения частот полос КР находилась в пределах $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Обработку спектров КР выполняли с помощью стандартной компьютерной программы. Все спектры записывали при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены структурная формула ЭБ и спектры поглощения смесей ДНК–ЭБ при различных значениях P/D .

Для свободного ЭБ максимум поглощения наблюдается при $\lambda = 480$ нм (рис. 1, б, спектр 1). При образовании комплекса с ДНК спектр поглощения бромистого этидия смещается в длинноволновую область ($\lambda_{\text{max}} = 524$ нм), это смещение сопровождается падением интенсивности в максимуме поглощения лиганда (рис. 1, б, спектры 2 и 3). Отметим, что в области рассмотренных концентраций ЭБ при $P/D > 8$ смеси ДНК–ЭБ однородны и гомогенны, однако при более низких значениях P/D мы наблюдали расслоение смесей ДНК–ЭБ на две оптически прозрачные фракции.

Из рис. 1, б, видно, что при $3 \leq P/D \leq 20$ спектры смесей ДНК–ЭБ различаются слабо в интервале длин волн 400–550 нм. Поэтому для характеристики разных типов связывания бромистого этидия с ДНК целесообразно было использовать дополнительно более чувствительные методы. Мы выбрали спектроскопию КР света, позволяющую установить атомные группы лиганда, участвующие в образовании комплексов ЭБ с ДНК при высоких и низких значениях P/D , а также конформационное состояние ДНК в комплексах.



а

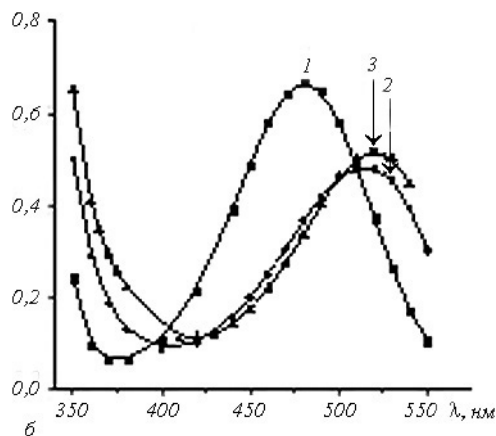


Рис. 1. Структурная формула бромистого этидия (3,8-диамино-5-этил-6-фенил-фенантридин бромид) (а) и спектры поглощения смесей ДНК–ЭБ (б) при P/D = 0 (1); P/D = 3,3 (2) и P/D = 20 (3); С_{ЭБ} = 1,1 · 10⁻⁴ М

Таблица 1
Частоты полос в спектре комбинационного рассеяния света и их отнесение для кристаллического образца и водных растворов бромистого этидия (ЭБ) при двух концентрациях (С)

Отнесение	Поликристаллический ЭБ, см ⁻¹	ЭБ (С 10 ⁻² М), см ⁻¹	ЭБ (С 10 ⁻⁴ М), см ⁻¹
Фенантридиновое кольцо (С-С, С-N)	1354	1350	1351
	1375	1372	1377
СН ₃ , деформационное колебание	1389	1394	1389
Дыхательное колебание фенантридинового кольца	1412	1417	1411
СН ₂ , деформационное колебание	–	1442	1434
СН ₃ , деформационное колебание	1454	1462	1452
Фенильное кольцо	1605	1605	1602
NH ₂ , деформационное колебание	1626	1627	1626

Известно, что ЭБ в водных растворах в зависимости от концентрации может находиться в мономерной и димерной формах [10]. Поэтому для определения спектральных различий мономерной и димерной форм ЭБ нами записаны спектры КР при разных концентрациях. В табл. 1 приведены частоты полос в спектрах КР для ЭБ в виде поликристаллического образца и в буферном растворе с концентрациями ЭБ 10⁻² и 10⁻⁴–10⁻⁵ М. Отнесения частот атомных групп бромистого этидия для спектров КР сделаны на основании литературных данных [11–14]. Полоса при = 1372–1377 см⁻¹ отнесе-

на к валентным симметричным колебаниям сопряженных связей С-С и С-N фенантридинового кольца [14]; полоса при = 1411–1417 см⁻¹ – к дыхательному колебанию фенантридинового кольца [12].

Из данных табл. 1 следует, что при большой концентрации бромистого этидия (10⁻² М), при которой в растворе образуется приблизительно равное количество мономерной и димерной форм лиганда [15], наблюдается полоса колебаний С-С-, С-N-групп фенантридинового хромофора с максимумом при = 1372 см⁻¹. Для растворов лиганда с меньшими концентрациями ЭБ (10⁻⁴–10⁻⁵ М, когда преобладает концентрация мономерной формы ЭБ [15]) этот максимум сдвигается в высокочастотную область к = 1377 см⁻¹. Низкочастотное смещение полосы до = 1372 см⁻¹ мы связываем с взаимодействием ароматических колец лиганда в димере.

На рис. 2 приведены предрезонансные спектры КР для свободного ЭБ и его смесей с ДНК, а в табл. 2 – соответствующие частоты полос КР и их отнесения для ЭБ в комплексе с ДНК. Поскольку при рассмотренных концентрациях ДНК в этих смесях уже практически отсутствует свободный лиганд, наблюдаемые различия в спектрах КР для бромистого этидия можно отнести к двум разным типам его связывания с ДНК. Как видно из спектра КР комплекса ДНК–ЭБ при P/D = 20 (рис. 2, спектр 3), колебание фенантридинового кольца с максимумом при = 1377 см⁻¹ сдвигается на 5 см⁻¹ в низкочастотную область по сравнению со свободным лигандом. Подобный низкочастотный сдвиг наблюдался также для димеров ЭБ, что свидетельствует о

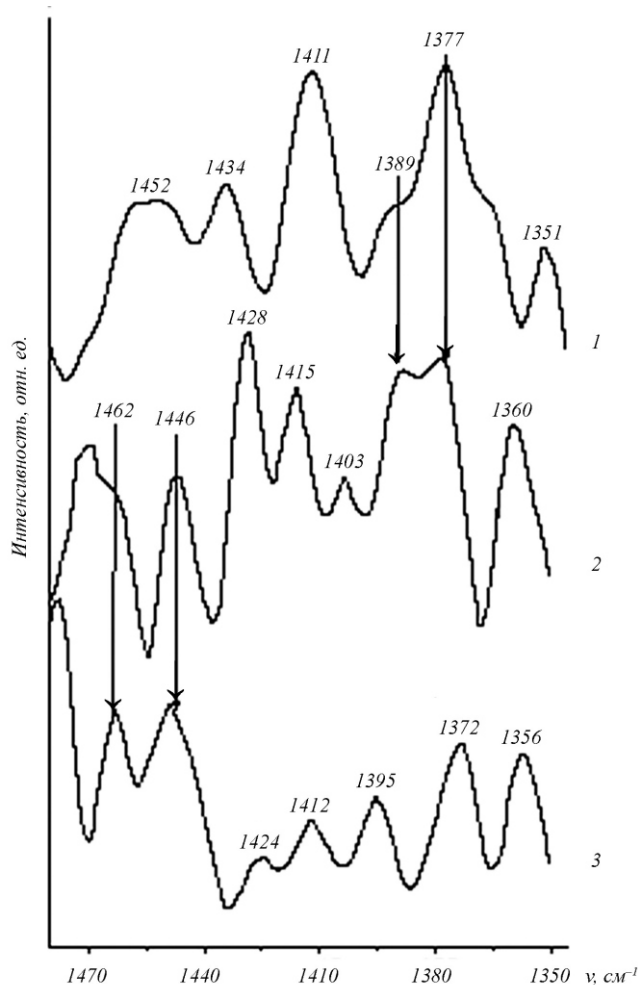


Рис. 2. Предрезонансные спектры комбинационного рассеяния растворов бромистого этидия (1) и комплексов ДНК–ЭБ при $P/D = 3$ (2) и $P/D = 20$ (3); $C_{ЭБ} = 1,1 \cdot 10^{-4}$ М в интервалах частот 1340–1470 см^{-1}

взаимодействии ароматических колец ЭБ с азотистыми основаниями ДНК. Поэтому такой сдвиг полосы фенантридинового кольца может быть критерием интеркаляции хромофора ЭБ между парами оснований ДНК. Аналогичный эффект наблюдался в спектрах КР ароматического соединения при его интеркаляции в ДНК [16].

Из спектра КР комплекса при $P/D = 3$ (рис. 2, спектр 2) видно, что полоса при 1377 см^{-1} не претерпевает низкочастотного сдвига по сравнению со свободным ЭБ. Мы предположили, что при низких значениях P/D в смесях ДНК–ЭБ образуются в основном комплексы по внешнему типу связывания, а концентрация комплексов по типу интерка-

Таблица 2

Частоты полос в спектре комбинационного рассеяния света и их отнесение для бромистого этидия (ЭБ) в комплексе с ДНК в частотном диапазоне 1350–1465 см^{-1}

Отнесение	ЭБ (С $1,1 \cdot 10^{-4}$ М), см^{-1}	ДНК–ЭБ	
		$P/D = 3$, см^{-1}	$P/D = 20$, см^{-1}
Фенантридиновое кольцо (С-С, С-N)	1351	1360	1356
	1377	1377	1372
CH_3 , деформационное колебание	1389	1388	1395
Дыхательное колебание фенантридинового кольца	1411	1415	1412
CH_2 , деформационное колебание	1434	1446	1447
CH_3 , деформационное колебание	1452	1462	1462

ляции невелика и в меньшей степени проявляется на спектрах КР.

Для деформационных колебаний CH_2 - и CH_3 -групп ЭБ наблюдаются высокочастотные сдвиги при образовании обоих типов комплексов с ДНК (рис. 2, спектры 2 и 3, отнесение полос см. в табл. 2). Из табл. 1 также видно, что эти колебания чувствительны к мономерно-димерному переходу. Однако объяснение такой зависимости требует дополнительных исследований.

Другая полоса фенантридинового кольца при 1411 см^{-1} (рис. 2, спектр 1), относящаяся к дыхательному колебанию кольца, в растворе с $P/D = 3$ сдвигается к более высокочастотному значению при 1415 см^{-1} . Подобный эффект отмечен в работе [12] при замещении атома водорода $\text{N}2\text{H}_2$ -группы ЭБ на кольцо 2-амино-4-хлор-6-метилпиримидина. При $P/D = 20$ эта полоса не изменяет своего положения. Такие отличия могут свидетельствовать и о разных типах образующихся комплексов лиганда с полинуклеотидной матрицей при высоких и низких значениях P/D , но для однозначного вывода необходим более детальный анализ, как и в случае CH_2 - и CH_3 -групп.

На рис. 3 приведены предрезонансные спектры КР смесей ДНК–ЭБ при разных значениях P/D , а также спектр свободного ЭБ. В эту спектральную

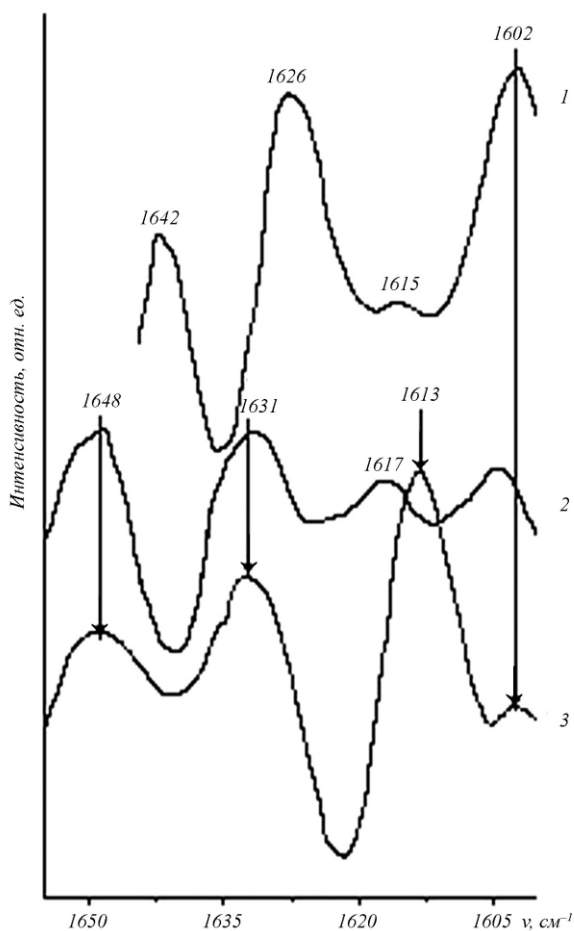


Рис. 3 Предрезонансные спектры комбинационного рассеяния растворов бромистого этидия (1) и комплексов ДНК–ЭБ при P/D = 3 (2) и P/D = 20 (3); C_{ЭБ} = 1,1 · 10⁻⁴ М в интервалах частот 1600–1660 см⁻¹

область основной вклад вносят деформационные колебания NH₂-групп [11, 13] и колебания фенильного кольца ЭБ [12, 13]. Соответствующие полосы КР бромистого этидия и их отнесения приведены в табл. 3.

Как видно из спектров 2 и 3 (рис. 3), а также из данных, приведенных в табл. 3, образование двух типов комплексов ДНК–ЭБ (P/D = 3 и P/D = 20) сопровождается высокочастотным сдвигом на 5 см⁻¹ полосы деформационных колебаний NH₂-групп фенантридинового хромофора лиганда [12]. Этот факт свидетельствует об образовании водородных связей между NH₂-группами ЭБ и акцепторными группами ДНК.

Согласно предложенной в работе [14] модели интеркаляции фенантридинового хромофора ЭБ,

Таблица 3
Частоты полос в спектре комбинационного рассеяния света и их отнесение для бромистого этидия (ЭБ) в комплексе с ДНК в частотном диапазоне 1600–1660 см⁻¹

Отнесение	ЭБ (C 1,1 · 10 ⁻⁴ М), см ⁻¹	ДНК–ЭБ	
		P/D = 3, см ⁻¹	P/D = 20, см ⁻¹
Фенильное кольцо	1602	1603	1602
Фенильное кольцо (C-C)	1615	1617	1613
NH ₂ , деформационное колебание	1626	1631	1631

такими акцепторными группами могут быть атомы N1 цитозина и N9 гуанина в противоположных цепях ДНК. Однако в работе [17] методом молекулярного докинга показана возможность образования H-связей между NH₂-группами ЭБ, интеркалированного в GC-сайт ДНК, с атомами O4' и O5' дезоксирибоз гуанина противоположных цепей. Такая модель подтверждается данными РСА комплекса ЭБ с динуклеотидом d(CpG), в котором обнаружена H-связь между NH₂-группой ЭБ и атомом O5' дезоксирибозы [18].

Таким образом, наблюдаемые на спектрах КР (рис. 3) высокочастотные сдвиги полос, относящихся к деформационному колебанию NH₂-групп лиганда, при высоких и низких значениях P/D свидетельствуют об образовании водородных связей этих групп с ДНК как в случае интеркалированного хромофора ЭБ, так и при внешнем связывании на поверхности молекулы ДНК. Эти водородные связи наряду с межплоскостными взаимодействиями ароматических колец хромофора ЭБ и азотистых оснований (цитозина и гуанина) дополнительно стабилизируют комплекс ДНК–ЭБ, что приводит к увеличению его термостабильности [19].

Для того чтобы установить, в каком структурном состоянии находится ДНК в комплексе с ЭБ при низких и высоких значениях P/D, нами получены спектры КР комплексов в области маркерных полос ДНК [6, 20–22].

На рис. 4 приведен частотный диапазон = 750–850 см⁻¹ для спектра ЭБ без комплекса, спектров смесей ДНК–ЭБ при двух значениях P/D и спектров ДНК в В- и А-форме. Очень слабая интен-

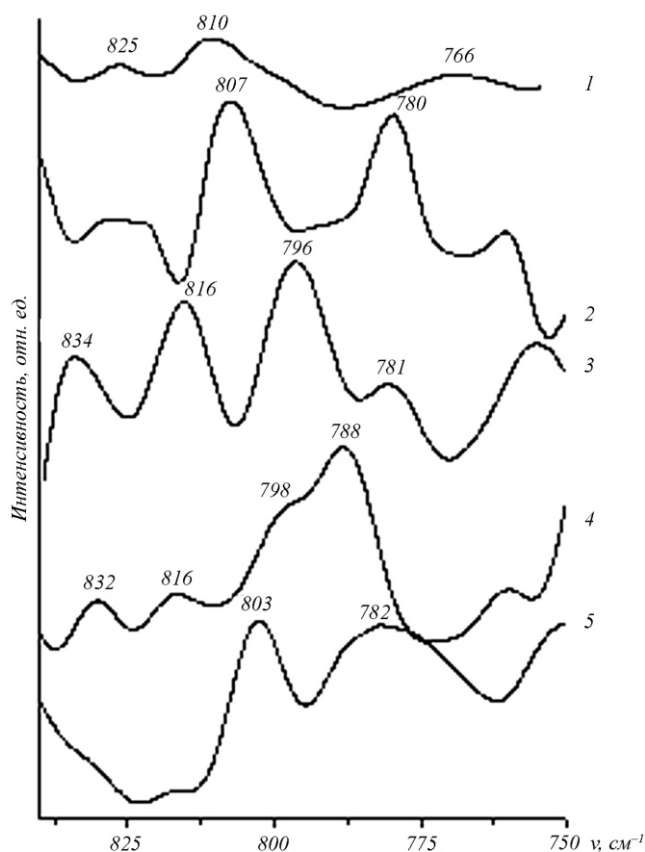


Рис. 4. Предрезонансные спектры комбинационного рассеяния ЭБ (1), комплексов ДНК–ЭБ при $P/D = 3$ (2); $P/D = 20$ (3) и спектры пленок ДНК при разных относительных влажностях: 96 % ОВ – В-ДНК (4) и 76 % ОВ – А-ДНК (5); $C_{ЭБ} = 1,1 \cdot 10^{-4}$ М

сивность полос КР ЭБ в этом спектральном диапазоне по сравнению со спектрами ДНК позволила нам пренебречь вкладом колебаний лиганда в спектр комплексов ДНК–ЭБ и наблюдать за поведением молекулы ДНК.

Из спектра 2 (рис. 4) видно, что при более плотном заполнении матрицы ДНК лигандом ($P/D = 3$) образование комплекса сопровождается появлением полос при $\nu = 780$ и 807 см^{-1} . Как известно [6, 20–22], эти полосы являются характерными маркерами А-формы ДНК и наши исследования подтверждают сделанные ранее выводы о том, что плотное заполнение матрицы ДНК бромистым этидием переводит ее из В-формы в А-подобную конформацию [3, 4, 13]. При $P/D = 20$ в спектре КР наблюдаются полосы при $\nu = 834$, 796 и 781 см^{-1} (рис. 4, спектр 3), характерные для В-формы ДНК [6, 20–22].

Следовательно, при больших значениях P/D (20) ДНК в комплексах с ЭБ находится в В-конформации.

Формирование комплекса при малых значениях P/D (3), по-видимому, сопровождается вытеснением бромистого этидия из интеркаляционного сайта при структурном переходе ДНК в А-подобную форму, при которой минорный желобок становится шире и мельче, что приводит к внешнему типу связывания лиганда.

Выводы. Таким образом, проведенное методом спектроскопии КР света исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК позволило установить, что при высоких значениях P/D , когда концентрация лиганда в растворе мала, стабилизация комплекса осуществляется не только за счет межплоскостных взаимодействий интеркалированного хромофора, но и вследствие образования Н-связей между аминогруппами ЭБ и атомами кислорода дезоксирибозы ($O4'$ и $O5'$). В этом случае ДНК сохраняется в В-форме. При низких значениях P/D формирование комплекса ДНК–ЭБ сопровождается структурным переходом ДНК из В- в А-подобную конформацию, а аминогруппы ЭБ взаимодействуют с сахаро-фосфатными группами полинуклеотидной матрицы, стабилизируя внешнюю «посадку» хромофора на поверхность молекулы ДНК.

Iu. N. Blyzniuk, T. V. Bolbukh, O. B. Kruglova, M. A. Semenov, V. Ya. Maleev

Investigation of complexation of ethidium bromide with DNA by the method of Raman spectroscopy

Summary

The investigation of complexation features of ethidium bromide (EB) with calf thymus DNA at the high and low ratios of biopolymer/ligand molar concentrations (P/D) was carried out using Raman spectroscopy and VIS-spectrophotometry. It was shown that EB binds to DNA with formation of two types of complexes: intercalation and exterior binding. The analysis of Raman spectra revealed that the amino groups of EB form the hydrogen bonds with acceptor atom groups of DNA in both types of complexes. A low extent of filling DNA structure by the ligand ($P/D = 20$) does not change the DNA B-form, while a high extent ($P/D = 3$) results in the conformation B-A transition.

Keywords: ethidium bromide; DNA; complex; Raman spectroscopy, spectrophotometry.

Ю. М. Близнюк, Т. В. Большух, О. Б. Круглова, М. О. Семенов,
В. Я. Малесев

Дослідження комплексоутворення бромистого етидію з ДНК методом спектроскопії комбінаційного розсіяння світла

Резюме

Методами спектроскопії комбінаційного розсіяння (КР) світла та спектрофотометрії у видимій області досліджено особливості комплексоутворення бромистого етидію (ЕБ) з тимусною ДНК при високих та низьких співвідношеннях концентрацій біополімер/ліганд (P/D). Показано, що взаємодія ЕБ з ДНК відбувається двома способами: за типом інтеркаляції та за рахунок зовнішнього зв'язування. З аналізу спектрів КР комплексів випливає, що аміногрупи ЕБ формують водневі зв'язки з атомами кисню O4' і O5' ДНК в обох типах комплексів. Низький ступінь заповнення ДНК лігандом (P/D = 20) не змінює В-форми ДНК, а високий (P/D = 3) – призводить до конформаційного В–А-переходу.

Ключові слова: бромистий етидію, ДНК, комплекс, спектроскопія комбінаційного розсіяння, спектрофотометрія.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Karapetian A. T., Mehrabian N. M., Terzikian G. A., Vardevanian P. O., Antonian A. P., Borisova O. F., Frank-Kamenetskii M. D. Theoretical treatment of melting complexes of DNA with ligands having several types of binding states on helical and single-stranded DNA // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*–1996.–**14**, N 2.–P. 275–283.
2. Minasyan S. H., Tavadyan L. A., Antonyan A. P., Davtyan H. G., Parsadanyan M. A., Vardevanyan P. O. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA // *Bioelectrochemistry*.–2006.–**68**, N 1.–P. 48–55.
3. Semenov M. A., Bolbukh T. V. The complexing of ethidium bromide and DNA in moist films as revealed by IR-spectroscopy // *Biopolymers and Cell*.–1987.–**3**, N 5.–P. 234–240.
4. Yuzaki K., Hamaguchi H. Intercalation-induced structural change of DNA as studied by 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy // *J. Raman Spectrosc.*–2004.–**35**, N 12.–P. 1013–1015.
5. Bresloff J. L., Crothers D. M. DNA-ethidium reaction kinetics: demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites // *J. Mol. Biol.*–1975.–**95**, N 1.–P. 103–123.
6. Erfurth S. C., Kiser E. J., Peticolas W. L. Determination of the backbone structure of nucleic acids and nucleic acid oligomers by laser Raman scattering // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.–1972.–**69**, N 4.–P. 938–941.
7. Semenov M. A., Gasan A. I., Bolbukh T. V., Maleev V. Ya. Hydration and the structural transitions of DNA from *Micrococcus lysodeikticus* in films // *Biophysics (Russia)*.–1996.–**41**, N 5.–P. 1007–1015.
8. Semenov M. A., Gasan A. I., Bolbukh T. V., Maleev V. Ya. Influence of the water on the structural transitions and

stabilization of DNA from *Clostridium perfringens* // *Biophysics (Russia)*.–1997.–**42**, N 3.–P. 591–598.

9. Grasselli J. G., Snavely M. K., Bulkin B. J. Chemical applications of Raman spectroscopy.–M.: Mir, 1984.–216 p.
10. Porumb H. The solution spectroscopy of drugs and the drug-nucleic acid interactions // *Progr. Biophys. Mol. Biol.*–1978.–**34**, N 3.–P. 175–195.
11. Parker F. S. Application of Infrared, Raman and Resonance Raman spectroscopy in biochemistry.–New York: Plenum press, 1983.–550 p.
12. Breuzard G., Millot J. M., Riou J. F., Manfait M. Selective interactions of ethidiums with G-quadruplex DNA revealed by surface-enhanced Raman scattering // *Anal. Chem.*–2003.–**75**, N 10.–P. 4305–4311.
13. Benevides J. M., Thomas G. J., Jr. Local conformational changes induced in B-DNA by ethidium intercalation // *Biochemistry*.–2005.–**44**, N 8.–P. 2993–2999.
14. Tsuboi M., Benevides J. M., Thomas G. J., Jr. The complex of ethidium bromide with genomic DNA: structure analysis by polarized Raman spectroscopy // *Biophys. J.*–2007.–**92**, N 3.–P. 928–934.
15. Veselkov A. N., Evstigneev M. P., Hernandez S. A., Rogova O. V., Veselkov D. A., Davies D. B. ¹H NMR study of hetero-association of ethidium homodimer and propidium iodide in water // *J. Struct. Chem.*–2004.–**45**, N 5.–P. 793–799.
16. Yan Q., Priebe W., Chaires J. B., Czernuszewicz R. S. Interaction of doxorubicin and its derivatives with DNA: elucidation by resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman spectroscopy // *Biospectroscopy*.–1997.–**3**, N 4.–P. 307–316.
17. Miroshnychenko K. V., Shestopalova A. V. The effect of drug-DNA interaction on intercalation site formation // *Molecular self-organization in micro-, nano, and macrodimensions: from molecules to water, to nanoparticles, DNA and proteins: Abstrs of NATO Adv. Res. Workshop*.–Kyiv, 2008.–P. 72–73.
18. Jain S. C., Sobell H. M. Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. VIII. Structures of two ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complexes containing ethidium: cytidylyl(3'-5')guanosine // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*–1984.–**1**, N 5.–P. 1179–1194.
19. Karapetian A. T., Permogorov V. I., Frank-Kamenetskii M. D., Lasurkin Yu. S. Thermodynamic investigation of the DNA complexes with dyes // *Mol. Biol. (Russia)*–1972.–**6**, N 6.–P. 867–873.
20. Martin J. C., Wartell R. M. Changes in Raman vibrational bands of calf thymus DNA during the B-to-A transition // *Biopolymers*.–1982.–**21**, N 3.–P. 499–512.
21. Prescott B., Steinmetz W., Thomas G. J., Jr. Characterization of DNA structures by laser Raman spectroscopy // *Biopolymers*.–1984.–**23**, N 2.–P. 235–256.
22. Thomas G. J., Jr., Benevides J. M., Overman S. A., Ueda T., Ushizawa K., Saitoh M., Tsuboi M. Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: Anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations // *Biophys. J.*–1995.–**68**, N 3.–P. 1073–1088.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 24.03.08