

2. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдро́за непарного шелкопряда / Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Там же.—1981.—7, № 7.— С. 985—995.
3. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдро́за большой вошнной моли / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Там же.— С. 996—1007.
4. Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Строение некоторых триптических пептидов полиэдри́на вируса ядерного полиэдро́за капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 4.— С. 194—198.
5. Строение некоторых триптических пептидов полиэдри́на вируса ядерного полиэдро́за озимой совки, *Agrotis segetum* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный // Там же.— № 6.— С. 312—317.
6. Сравнительное биохимическое исследование полиэдри́нных белков вирусов ядерного полиэдро́за / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биохимия.—1978.—43, № 12.— С. 2189—2195.
7. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдро́за и вируса грануле́за озимой совки, *Agrotis segetum* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 3.— С. 121—124.
8. Серусодержащие аминокислоты полиэдри́нного белка вируса желтухи тутового шелкопряда / С. Б. Серебряный, В. М. Кавсан, В. К. Кибирев, М. С. Кацман // Химия природ. соединений.—1968.— № 3.— С. 174—178.
9. Gray W. R. Sequence degradation plus dansylation // Meth. Enzymol.—1967.—11.— Р. 469—475.
10. Первичная структура цитоплазматической аспартатами́нотрансферазы из сердечной мышцы свиньи. Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролизата / Е. И. Виноградова, М. Ю. Фейгина, Н. А. Алданова и др. // Биохимия.—1973.—38, № 1.— С. 3—21.
11. Хроматография в тонких слоях полиами́да / П. Д. Решетов, Г. Г. Честухина, С. Махмутов, А. С. Пышкина // Химия природ. соединений.—1971.— № 1.— С. 66—88.
12. Easley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.—1965.—107, N 2.— Р. 386—388.
13. Триптические фрагменты малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдро́за тутового шелкопряда. I. Разделение и аминокислотный состав фрагментов / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман, С. Б. Серебряный // Биоорган. химия.—1978.—4, № 8.— С. 1029—1035.
14. Eppstein D. A., Thoma J. A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infected the cabbage looper // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1975.—62, N 2.— Р. 478—484.
15. Сравнение аминокислотной последовательности белков тел включений вирусов ядерного полиэдро́за тутового, непарного шелкопря́дов и большой вошнной моли / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биоорган. химия.—1981.—7, № 7.— С. 1008—1015.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев

Получено 10.12.84

УДК 577.32

О ПОГЛОЩЕНИИ РАСТВОРОВ ДНК В ДИАПАЗОНЕ 9—12 ГГц

В. Я. Малеев, В. А. Кашпур, Г. М. Глибицкий,
А. А. Красницкая, Е. В. Веретельник

Введение. В последнее время в связи с проблемой нетеплового воздействия электромагнитного излучения на биологические объекты выполнен ряд работ, посвященных изучению диэлектрических свойств растворов биополимеров в СВЧ-диапазоне. Так, Свайкорд и соавт. [1] с помощью оптического гетеродинного метода обнаружили в диапазоне 8—12 ГГц значительное (на частоте 8 ГГц в 25 раз большее, чем у воды) поглощение электромагнитной энергии молекулами ДНК из *E. coli*. Исследуя этот эффект повторно, но уже на другом образце ДНК *E. coli* более точным диэлектрометрическим методом [2], авторы не нашли заметного превышения поглощения раствора ДНК по сравнению с рас-

творителем. Однако в процессе инкубации исследуемого раствора ДНК с ферментом дезоксирибонуклеазой наблюдали интенсивное дополнительное поглощение во всем диапазоне 9—12 ГГц. Так, удельное поглощение ДНК на частоте 11 ГГц после 85 мин инкубации с ДНКазой оказалось в 400 раз большим, чем поглощение эквивалентного количества воды. Авторы объяснили наблюдаемые эффекты микроволнового поглощения наличием во фрагментах ДНК соответствующей длины продольных акустических модов. Такую возможность теоретически рассматривали Ван Зандт и соавт. [3].

При изучении в диапазоне частот 2—10 ГГц водных растворов плазмидной ДНК, молекулы которой имеют строго определенную длину [4], той же группой исследователей было затем обнаружено резонансное поглощение большой интенсивности. Вместе с тем Фостер и соавт. [5] не обнаружили какого-либо поглощения электромагнитных волн молекулами нативной ДНК из тимуса теленка в диапазоне 0,1—12 ГГц. Не найдено избыточного поглощения ДНК и Такашимой и соавт. [6] в частотном интервале 0,1 МГц—70 ГГц, хотя авторы и указывают, что они исследовали ДНК из другого источника при недостаточной высокой разрешающей способности их метода.

В наших исследованиях растворов ДНК из тимуса теленка [7] на длине волны 7,6 мм также не было обнаружено поглощения СВЧ-энергии молекулами ДНК. Вместо этого наблюдали небольшое уменьшение коэффициента поглощения, что естественно связать с эффектами гидратации и исключенного объема. В связи с такой противоречивостью экспериментальных результатов нами было предпринято специальное изучение микроволнового поглощения растворами ДНК в условиях подобных тем, которые описаны в [1, 2].

Материалы и методы. В качестве образца первоначально была взята ДНК из эритроцитов цыплят фирмы «Reanal», ВНР (натриевая соль, молекулярная масса — $2\text{--}3 \cdot 10^6$, гиперхромный эффект — 38 %). Очевидно, что длина ДНК в данном случае только в 2—5 раз превышала длину всей плазмидной ДНК или ее фрагментов [4]. Исследования проводили также с раствором ДНК, фрагментированной двумя способами: ультразвуковой обработкой по методике Эльпинера [8] и ферментативным гидролизом посредством дезоксирибонуклеазы I («Boehringer», ФРГ) в течение 2 ч. Фрагментацию ДНК контролировали оценкой вязкости ее растворов. Концентрация ДНКазы составляла 0,1 мг/мл. Время облучения ультразвуком 80 мин, частота — 22 кГц. Известно [8], что такое воздействие ультразвука приводит к образованию фрагментов различной длины. Средние размеры фрагментов составляют около 100 нм, а соответствующая молекулярная масса — около $2 \cdot 10^5$. Можно полагать, что среди фрагментов найдутся и такие, для которых будут выполнены условия резонансного поглощения.

Другая серия экспериментов была проведена с ДНК, выделенной нами из *E. coli*. ДНК выделяли методом, аналогичным описанному в [2]. После конечного осаждения спиртом ДНК растворяли в 50 мМ трис-HCl буферном растворе, содержащем 0,15 М NaCl и диализовали в течение 48 ч при температуре 4°C. Сразу после диализа ДНК использовали в экспериментах. Содержание ДНК определяли спектрофотометрически, отношение A_{260} / A_{280} — около 1,9, гиперхромный эффект — 38 %. Фрагментацию раствора ДНК производили с помощью ДНКазы в течение 2 ч.

Измерения коэффициента поглощения α выполняли методом переменной толщины [9]. Длину ячейки регулировали с помощью микровинта и считали оптимальной, если коэффициенты отражений от ограничивающих кювету поверхностей не зависели от толщины рабочего слоя жидкости. Тогда

$$I = I_0 e^{-2\alpha(x-x_0)},$$

$$\alpha = \ln \frac{I_0}{I} / 2(x - x_0),$$

где I_0 и I — интенсивности сигналов, прошедших через кювету длиной x_0 и x соответственно. Мы определяли коэффициенты поглощения растворителя α_0 и исследуемого

раствора α и вычисляли относительное поглощение $P = \frac{\alpha}{\alpha_0}$. Погрешность ΔP составляла $\pm 0,01$, температура — 25°C. Поскольку согласно [2] поглощение раствора ДНК возрастает на несколько десятков процентов во всем диапазоне 9—12 ГГц, мы для повышения точности измерения ограничились несколькими фиксированными частотами в этом диапазоне.

Результаты и обсуждение. Результаты измерений сведены в табл. 1 и 2. Видно (табл. 1), что относительный коэффициент поглощения раствора нативной ДНК из эритроцитов ($P'_н$) и коэффициент поглощения в случае той же ДНК, но фрагментированной ультразвуком ($P'_{уз}$), практически не отличаются от 1 (концентрация 0,5 %). То же можно сказать и о средних значениях коэффициентов $P'_{\phi 1}$ и $P'_{\phi 2}$ для растворов ДНК из эритроцитов, но фрагментированной ДНКазой (концентрация ДНК 0,2 и 0,6 % соответственно). В случае раствора ДНК из *E. coli* (концентрация 0,5 %) коэффициенты поглощения для образцов нативной ($P''_н$) и фрагментированной (P''_{ϕ}) ДНК также практически не отличаются от 1.

Таблица 1

Относительные коэффициенты поглощения растворов нативных и фрагментированных ДНК в диапазоне 9—12 ГГц

Relative absorption coefficients of the native and nicked DNA solutions in the 9—12 GHz frequency range

| Частота, ГГц | $P'_н$ | $P'_{уз}$ | $P'_{\phi 1}$ | $P'_{\phi 2}$ | $P''_н$ | P''_{ϕ} |
|--------------|--------|-----------|---------------|---------------|---------|--------------|
| 8,81 | 0,99 | 0,98 | 0,98 | 1,01 | 1,015 | 1,01 |
| 9,41 | 0,985 | 1,0 | 1,005 | 1,0 | 0,995 | 1,01 |
| 9,81 | 0,99 | 1,0 | 1,005 | 1,0 | 0,995 | 1,01 |
| 10,08 | — | — | 1,0 | 0,99 | 1,0 | 1,01 |
| 10,24 | 0,995 | 0,99 | — | — | — | — |
| 10,90 | 0,99 | 0,985 | — | — | — | — |
| 11,26 | 0,99 | 0,99 | — | — | — | — |

Таблица 2

Зависимость относительных коэффициентов поглощения растворов ДНК в диапазоне 9—12 ГГц от времени действия ДНКазы

Dependence on the time of DNase action for the relative absorption coefficients of the DNA solutions in the 9—12 GHz frequency range

| Коэффициент | Время действия ДНКазы, мин | | | | | |
|---------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 10 | 30 | 50 | 70 | 90 | 110 |
| $P'_{\phi 1}$ | 1,015 | 1,005 | 1,0 | 0,995 | 1,0 | 1,01 |
| $P'_{\phi 2}$ | 1,005 | 0,995 | 0,995 | 0,98 | 1,005 | 1,005 |
| P''_{ϕ} | 1,01 | 1,0 | 1,01 | 1,005 | 1,01 | 1,01 |

В табл. 2 представлены относительные коэффициенты поглощения растворов ДНК в зависимости от времени действия ДНКазы. Из приведенных данных неправомерно вывод о каком-либо изменении поглощения в процессе действия ДНКазы. Мы следили также за величиной сигнала, прошедшего через ячейку в первые секунды и минуты после введения фермента. Изменение коэффициента поглощения хотя бы на несколько десятых процента должно приводить к надежно регистрируемому увеличению выходного сигнала. Однако такого эффекта не наблюдали.

Возможно, эффекты, обнаруженные в [1, 2], обусловлены тем фактом, что использованный авторами эталонный растворитель, по отношению к которому определяли коэффициент поглощения раствора ДНК,

не содержал всех компонентов исследуемого вещества, в частности соли $MgCl_2$, необходимой для действия ДНКазы. В то же время согласно нашим измерениям наличие в растворе 1 % $MgCl_2$ повышает коэффициент поглощения до 7 %. Влияние $MgCl_2$ на диэлектрические свойства растворов хорошо известно и объясняется ионной проводимостью (по нашим измерениям электропроводность раствора ДНК в буфере с 1 % $MgCl_2$ в 1,8 раза больше, чем в аналогичном растворе без $MgCl_2$). Не принимая во внимание этого эффекта, наблюдаемое увеличение поглощения на 7 % в растворе ДНК в присутствии ДНКазы можно объяснить собственным поглощением молекул ДНК, которое при концентрации 0,2 % будет составлять величину, в 35 раз превышающую поглощение эквивалентного количества воды. Однако учет вклада в поглощение на высоких частотах электропроводности раствора за счет 1 % $MgCl_2$ по формуле $\alpha \sim \sigma/f$, где σ — электропроводность на частоте 10 кГц, f — частота, уменьшает избыточное поглощение до величины менее 1 %, что находится в пределах погрешности эксперимента.

Таким образом, мы не смогли подтвердить на образцах ДНК из эритроцитов цыплят и *E. coli* наличия избыточного по сравнению с растворителем поглощения электромагнитного излучения в диапазоне частот 9–12 ГГц.

ABSORPTION OF DNA SOLUTIONS IN THE 9-12 GHz FREQUENCY RANGE

V. Ya. Maleev, V. A. Kashpur, G. M. Glibitsky, A. A. Krasnitskaya, Ye. V. Veretelnik

Institute of Radiophysics and Electronics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

Summary

The microwave energy absorption in the 9-12 GHz range is investigated in chicken erythrocytes and *E. coli* DNA aqueous solutions, both for native macromolecules and those fragmented by ultrasound or by DNase. In all cases the characteristic absorption of DNA was not observed as well as for the *E. coli* DNA exposed to DNase for two hours. It is shown that the ion influence on the dielectric properties of DNA aqueous solutions must be taken into account carefully.

1. Swicord M. L., Davis C. C. Microwave absorption of DNA between 8 and 12 GHz // *Biopolymers*.—1982.—21, N 12.—P. 2453—2460.
2. Chain-length dependent microwave absorption of DNA / M. L. Swicord, G. S. Edwards, J. L. Sagrapanti, C. C. Davis // *Ibid.*—1983.—22, N 12.—P. 2513—2516.
3. Van Zandt I. L., Kohli M., Prohowsky E. W. Absorption of microwave radiation by DNA double helix in aquo // *Ibid.*—1982.—21, N 7.—P. 1465—1468.
4. Edwards G. S., Davis C. C. Resonant microwave absorption of selected DNA molecules // *Phys. Rev. Lett.*—1984.—53, N 13.—P. 1284—1287.
5. Microwave dielectric absorption of DNA in aqueous solution / K. P. Foster, M. A. Stuchly, A. Kraszewsky, S. S. Stuchly // *Biopolymers*.—1984.—23, N 3.—P. 593—599.
6. Dielectric behavior of DNA solution at radio and microwave frequencies / S. Takashima, C. Gabriel, R. J. Sheppard, E. H. Grant // *Biophys. J.*—1984.—46, N 1.—P. 29—34.
7. Кашпур В. А., Малеев В. Я. Гидратация нативной и денатурированной Na-ДНК в растворе по данным СВЧ-диэлектromетрии // Тез. докл. III Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров.—Харьков, 1977.—С. 60—61.
8. Эльпшнер И. Е. Ультразвук. Физико-химическое и биологическое действие.—М.: Физматгиз, 1963.—420 с.
9. Брандт А. А. Исследование диэлектриков на сверхвысоких частотах.—М.: Физматгиз, 1963.—404 с.

Ин-т радиофизики и электроники АН УССР,
Харьков

Получено 4.06.85