

## Электрофоретическое исследование конформационных переходов в поли(G) под действием моновалентных катионов

М. И. Зарудная, А. В. Степанюгин, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

m.i.zarudna@imbg.org.ua

*Впервые методом электрофореза изучены конформационные переходы в поли(G) под действием соли. Показано, что при концентрации моновалентных катионов > 10 мМ наблюдается только одна зона полимера, соответствующая его четырехцепочечной форме. При более низких концентрациях определяются две перекрывающиеся зоны. Медленнее мигрирующая зона соответствует четырехцепочечной форме поли(G), а быстрее мигрирующая — одноцепочечной. Получены электронные спектры поглощения ряда гомополирибонуклеотидов, окрашенных толудиновым голубым (ТГ) в агарозных гелях. Выявлено, что форма спектра зависит как от гомополимера, так и от его конформации.  $\Delta\lambda_{max}$  спектров поглощения ТГ в комплексе с одно- и четырехцепочечной формами поли(G) составляет примерно 20 нм.*

*Ключевые слова:* поли(G), конформационные переходы гомополирибонуклеотидов, электрофорез, толудиновый голубой, электронные спектры поглощения.

**Введение.** Гомополи- и олигорибонуклеотиды являются составными элементами природных РНК и выполняют определенные биологические функции [1]. Поли(G) способен образовывать четырехцепочечные структуры (квадруплексы), содержащие водородносвязанные тетрады гуаниновых оснований [2]. В клеточных и вирусных РНК поли(G)-тракты встречаются лишь в 3'-концевой области минус-цепей РНК кардиовирусов и вирусов ящура из семейства пикорнавирусов [1]. В настоящее время неизвестно, выполняют ли они какую-либо функцию. Однако в природных РНК довольно часто встречаются олиго(G)-тракты, способные самоассоциироваться с образованием квадруплексов и предположительно являющиеся функциональными элементами (обзор в [3]).

Изучение конформационных переходов в поли(G) и других гомополирибонуклеотидах важно не только для выяснения механизмов их функционирования в клетках и вирусах, но и по той причине, что эти полимеры используются для выявления специфичности РНК-связывающих белков (например, [4–6]).

Для исследования конформационных переходов в гомополирибонуклеотидах мы впервые применили такие методы, как электрофорез и протонная буферная емкость, что позволило получить новые данные о конформационных переходах в поли(A) и поли(C) [7–12]. В наших ранних работах [7–9] электрофорез гомополирибонуклеотидов проводили при ионных силах ( $I$ ) от 10 до 60 мМ и рН от 7,8 до 4,9 в растворах, не содержащих солей двухвалентных металлов. В этих условиях наблюдалась одна узкая симметричная зона поли(G), за

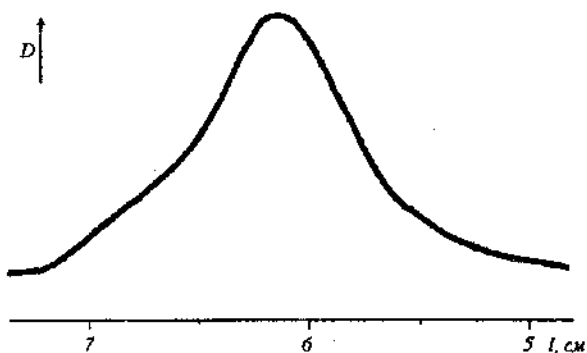


Рис. 1. Денситограмма поли(G) при  $I = 10,2$  мМ; 0,8 %-я агароза

исключением эксперимента, проведенного при наиболее низкой ионной силе ( $I = 10,2$  мМ) (рис. 1). В этом эксперименте наблюдалось небольшое уширение нижней части лидирующей границы зоны. Одной из причин этого уширения могло быть появление при  $I \sim 10$  мМ новой зоны полимера, перекрывающейся с основной зоной, характерной для более высоких значений ионной силы.

Литературные данные о зависимости структуры поли(G) от концентрации моновалентных катионов противоречивы. С одной стороны, исследования, проведенные методами УФ спектроскопии [13, 14], электронной микроскопии [15], кинетики триптического обмена [16] и другими, свидетельствуют в пользу того, что при очень низких ионных силах ( $H_2O$ , 2 мМ NaCl или 1 мМ фосфатный буфер, содержащий 1 мМ ЭДТА) поли(G) находится в основном в четырехцепочечной форме. С другой стороны, иммунологическое исследование [17] выявило, что в  $H_2O$  или 5 мМ трисе этот полимер находится преимущественно в одноцепочечной форме. Аналогичный результат получен при изучении поли(G) в  $H_2O$  методом комбинационного рассеяния света (КРС) [18].

Для выяснения природы асимметрии электрофоретической зоны поли(G) при  $I \sim 10$  мМ, а также исследования зависимости структуры этого полимера от концентрации одновалентных катионов методом, ранее не используемым для этой цели, в настоящей работе изучены электрофоретические характеристики поли(G) при ионных силах ниже 10 мМ в отсутствие двухвалентных катионов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ионной силе 4—6 мМ большая часть макромолекул поли(G) находится в четырехцепочечной

форме, а 20—30 % — в одноцепочечной. Противоречия между литературными данными [13—18], а также между нашими результатами и данными литературы [13—17] могут быть объяснены различными условиями экспериментов и разной чувствительностью используемых методов.

**Материалы и методы.** Использовали препарат поли(G) фирмы «Serva» (ФРГ), агарозу фирмы «BioRad» (США), краситель толуидиновый голубой (ТГ) О фирмы «Serva».

Раствор поли(G) (2,7 мг/мл) диализовали против буфера 10 мМ трис-ацетат, pH 7,0, содержащего 1 мМ ЭДТА.

Электрофорез проводили при комнатной температуре в трубках диаметром 0,6 см в электрофоретической камере ОЕ-110 при напряжении 60 В. Эксперименты выполнены с использованием такого варианта электрофореза [9], при котором в буферный раствор для электрофореза помещали трубки с агарозными гелями, приготовленными в разных растворах. Буферные растворы для электрофореза содержали трис (от 3 до 5 мМ), уксусную кислоту, с помощью которой изменяли pH растворов, и динатриевую соль ЭДТА (от 0,3 до 1 мМ). Агарозу готовили или в буферных растворах для электрофореза (в экспериментах при  $I = 4$ —6 мМ) или в более концентрированных растворах (в экспериментах при  $I \sim 14$  мМ). Гели окрашивали на протяжении 1 ч 0,01 %-м ТГ, растворенным в том же буфере, в котором готовили агарозу. Окрашенные и отмытые от красителя гели сканировали на приборе Хромоскан-200 (Англия).

Электронные спектры поглощения в диапазоне длин волн 400—750 нм в разных участках зоны окрашенного полинуклеотида снимали на спектрофотометре «Shimadzu» (Япония), при этом контролем служил спектр участка геля, не содержащего полинуклеотид.

**Результаты и обсуждение.** *Электрофорез поли(G) при разных ионных силах.* На рис. 2 представлены денситограммы диализованного препарата поли(G) при ионных силах 5,6 (зона А) и 14,4 мМ (зона В). Использован вариант электрофореза (см. «Материалы и методы»), позволяющий в одном эксперименте проводить электрофорез полимеров при разных значениях ионной силы и pH. Как видно из рис. 2, при  $I = 14,4$  мМ зона поли(G) узкая и довольно симметричная. Такие же зоны поли(G) наблюдались и в наших ранних работах [7, 8] при  $I$  от  $\sim 12$  до 60 мМ. Форма зоны А

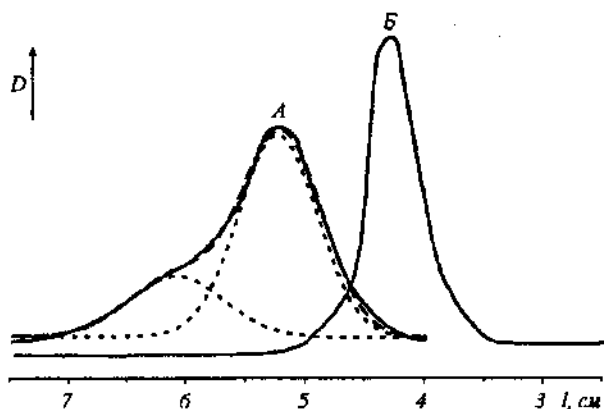


Рис. 2. Денситограммы поли(G) при разных ионных силах, pH ~7,0; 0,8 %-я агароза: А —  $I = 5,6$  мМ; Б —  $I = 14,4$  мМ

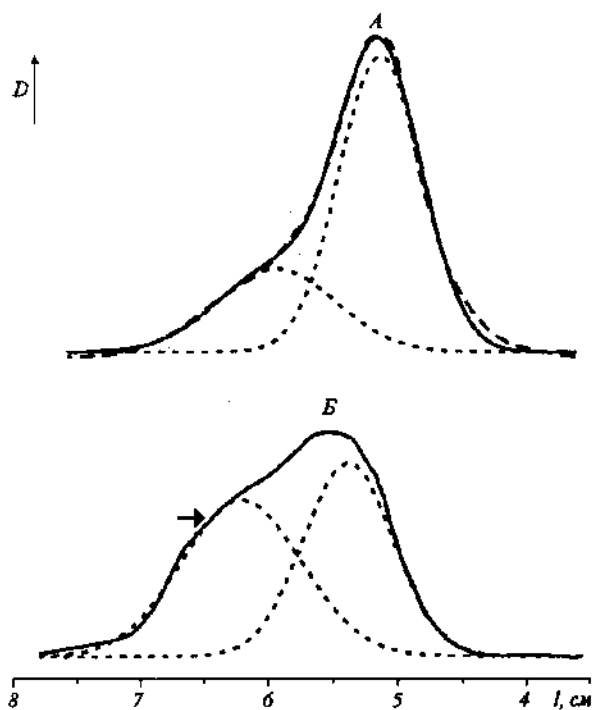


Рис. 3. Денситограммы поли(G) при  $I = 5,6$  мМ; 0,8 %-я агароза: А — образец не прогрет; Б — образец прогрет в течение 15 мин при температуре 90—93 °С. Стрелкой обозначена точка, в которой снят спектр поглощения, показанный на рис. 5 (спектр 2)

отличается от формы зоны Б. Лидирующая граница этой зоны имеет заметное плечо. Асимметрия зоны значительно более явная, чем на рис. 1 (при  $I = 10,2$  мМ).

Полученные результаты можно объяснить тем, что при низких ионных силах (< 10 мМ) четырех-

цепочечный поли(G) частично диссоциирует с образованием одноцепочечной формы, которая мигрирует с большей скоростью, чем квадруплекс. В условиях эксперимента зоны этих форм полимера частично перекрываются. На рис. 2 пунктиром показано разложение результирующей зоны А на составляющие зоны.

Следует отметить, что в эксперименте, представленном на рис. 2, на гели, приготовленные как при  $I = 14,4$  мМ, так и при  $I = 5,6$  мМ, наносили поли(G), растворенный в диализном буфере (при ионной силе 14,2 мМ). Появление плеча у зоны А свидетельствует о том, что диссоциация квадруплекса при уменьшении ионной силы произошла во время электрофореза, скорее всего, сразу же после вхождения образца в гель. Денситограммы с таким же плечом у быстрее мигрирующей зоны получены и с образцом, предварительно выдержанным в растворе с  $I = 5,6$  мМ в течение 20 ч перед проведением электрофореза. Эти результаты хорошо согласуются с данными авторов работы [18], которые сообщают о том, что при изменении ионной силы две формы поли(G) легко переходят одна в другую либо в результате диализа, либо при непосредственном добавлении соли в раствор. В нашем случае роль диализа играет электромиграция полимера, растворенного в одних условиях, в гель, приготовленный в других условиях.

На рис. 3 представлены результаты электрофореза поли(G), предварительно прогретого при  $I = 5,6$  мМ в течение 15 мин при температуре 90—93 °С и охлажденного на протяжении 1 ч при комнатной температуре (рис. 3, Б), по сравнению с электрофорезом непрогретого образца (рис. 3, А). Видно, что после прогрева относительное количество быстрее мигрирующей формы полимера заметно увеличилось (примерно в 1,7 раза). Этот результат можно объяснить тем, что образовавшиеся в результате плавления квадруплекса одноцепочечные макромолекулы поли(G) не успели за время охлаждения полностью реассоциироваться в квадруплекс, поскольку образование четырехцепочечной формы полимера является реакцией четвертого порядка, скорость которой зависит от концентрации полимера и одновалентных катионов в растворе [19]. Полученный результат свидетельствует в пользу того, что плечо зоны поли(G) образуется за счет появления при низких ионных силах одноцепочечной формы полимера, а не из-за каких-либо иных причин.

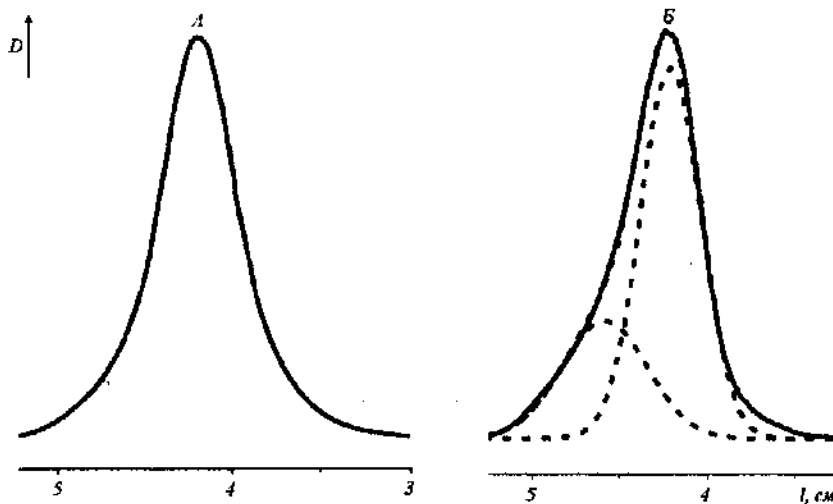


Рис. 4. Денситограммы поли(G), растворенного в 0,1 мМ ЭДТА, pH 6,5, при  $I = 14,2$  мМ; 1,0 %-я агароза: А — образец не прогрет; Б — образец прогрет в течение 15 мин при температуре 100 °С

Как упоминалось выше, электрофоретические эксперименты выполняли с диализованным препаратом поли(G). Подобные результаты получены и в опытах с использованием недиализованного препарата. С таким образцом был проведен дополнительный эксперимент. Учитывая, что скорость реассоциации G-квадруплекса возрастает при увеличении ионной силы [19], поли(G), растворенный в 0,1 мМ ЭДТА и прогретый в течение 15 мин при температуре 100 °С, наносили после охлаждения на трубки с агарозой, приготовленной при  $I = 14,2$ . Однако, как видно из рис. 4, при этой ионной силе, как и при  $I = 5,6$  мМ (рис. 3), реассоциация квадруплекса неполная: зона Б (прогретый образец) имеет небольшое плечо по сравнению с зоной А.

Следует отметить, что при увеличении ионной силы размеры молекул полирибонуклеотидов уменьшаются вследствие ослабления электростатического отталкивания отрицательно заряженных фосфатных групп. В результате полимеры хуже разделяются по размерам в агарозных гелях при высоких ионных силах, чем при низких. В частности, наличие одной зоны поли(G) при  $I \sim 14$  мМ могло быть связано с тем, что в этих условиях величины подвижностей одноцепочечной и четырехцепочечных форм более близки между собой, чем при низкой ионной силе, и эти формы не разделяются при электрофорезе. Результаты эксперимента, показанного на рис. 4, Б (прогретый образец), исключают такой вариант — одноцепочечная и четырехцепочечная формы поли(G) разделяются при электрофорезе при  $I \sim 14$  мМ, хотя и хуже, чем при более низких ионных силах.

Таким образом, исследование поли(G) методом электрофореза показало, что при ионной силе, равной или выше 14 мМ, он находится в четырехцепочечной форме, а при  $I = 4—6$  мМ 20—30 % молекул полимера находятся в одноцепочечной форме.

Сравним полученные нами результаты с литературными данными, описанными во вступлении. В работах [13—16] поли(G) в  $H_2O$ , 2 мМ NaCl или 1 мМ трис, содержащем 1 мМ ЭДТА, уже находится в четырехцепочечной форме, тогда как в наших экспериментах при концентрации одновалентных катионов, равной 4—6 мМ, в этой форме находится лишь 70—80 % молекул поли(G). Такое противоречие можно объяснить, во-первых, тем, что чувствительность некоторых из использованных в [13—16] методов могла быть недостаточно высокой, чтобы зарегистрировать одноцепочечную форму. Во-вторых, коммерческие препараты поли(G) выпускают в виде соли калия или натрия и, по-видимому, они представляют собой квадруплексы. Расстворение коммерческого препарата в воде [15] или 1 мМ трис, содержащем 1 мМ ЭДТА [16], могло не приводить к диссоциации квадруплексов, поскольку экранирующие катионы не удалялись из раствора. В работе [14] после перевода поли(G) в форму соли его дополнительно диализовали против  $H_2O$ , но, скорее всего, этот диализ не был интенсивным и его проводили лишь для удаления излишков соли из раствора перед лиофилизацией, а не для обессоливания поли(G), и полимер оставался в форме квадруплекса.

С другой стороны, авторы работы [17] диали-

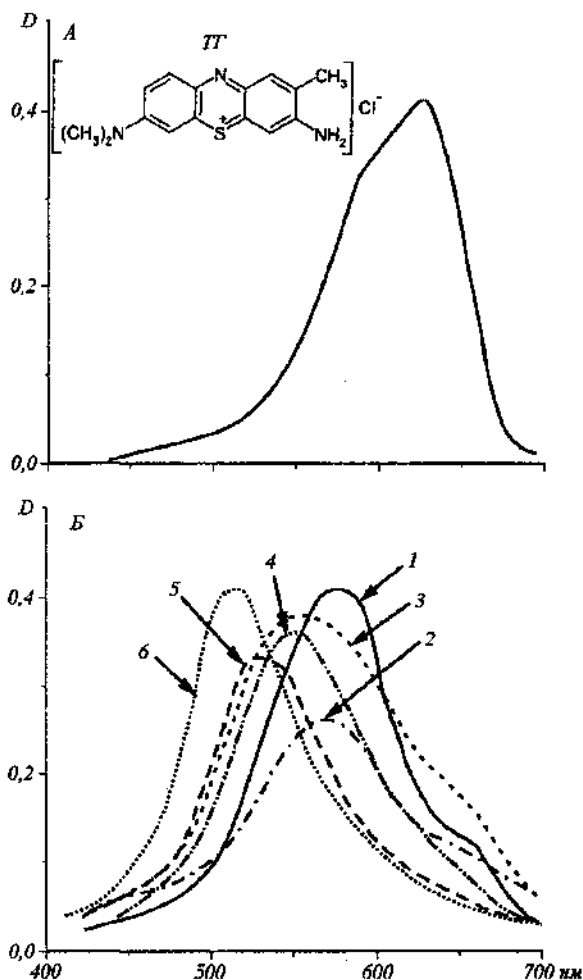


Рис. 5. Электронные спектры поглощения толуидинового голубого (ТГ) (А) и гомополирибонуклеотидов, окрашенных ТГ (Б) (Б: I — 4—6 мМ; 1 — поли(А), рН 4,9; 2 — одноцепочечный поли(Г), рН 7,0; 3 — четырехцепочечный поли(Г), рН 7,0; 4 — поли(С), рН 5,7; 5 — поли(У), рН 7,6; 6 — поли(С), рН 7,6)

зовали поли(Г), чтобы максимально удалить экранирующие моно- или дикатионы и исследовать конформационные переходы этого полимера в зависимости от концентрации катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$  иммунологическим методом. Из зависимости количества осажденного антителом поли(Г) от концентрации  $\text{NaCl}$ , приведенной в этой работе и преобразованной нами в зависимость относительной концентрации четырехцепочечной формы поли(Г) от концентрации соли [1], следует, что в  $\text{H}_2\text{O}$  или в 5 мМ трисе поли(Г), в основном, находится в одноцепочечной форме и при низких ионных силах, используемых нами (4—6 мМ), концентрация

четырёхцепочечной формы не превышает 20 %, а при  $I = 14,4 \text{ мМ}$  — 40 %, хотя, по нашим данным, она составляет соответственно 70—80 и 100 %. Возможно, что при концентрации полимера, используемой авторами (0,3 мМ) [17], реакция не достигала равновесия за время инкубации полимера и антитела, поскольку скорость образования квадруплекса существенно зависит от концентрации полимера [19]. В наших экспериментах на гели наносили растворы поли(Г) в концентрации ~1,7 мМ. Кроме того, образование квадруплексов в работе [17] происходило в присутствии антитела, что могло влиять на скорость его формирования.

В работе [18] конформационные переходы в поли(Г) изучали методом КРС. Переход поли(Г) из одноцепочечной формы в четырехцепочечную происходил почти полностью, когда концентрация монокатионов превышала таковую полимера в два раза, т. е. в 0,02 N  $\text{NaCl}$ . В 0,01 N соли переход был неполным, а в  $\text{H}_2\text{O}$  полимер находился, в основном, в одноцепочечной форме. Результаты этой работы согласуются с нашими данными.

Электронные спектры поглощения гомополирибонуклеотидов, окрашенных толуидиновым голубым в агарозных гелях. В данной работе, как и в наших ранних работах [7—9], для обнаружения гомополимеров агарозные гели после проведения электрофореза окрашивали толуидиновым голубым (рис. 5, А, вставка). Ранее мы окрашивали все гомополимеры в слабощелочной среде вне зависимости от того, при каких условиях проводили электрофорез. В таких условиях поли(А), поли(С) и поли(У) находятся в одноцепочечной форме, а поли(Г) (при достаточно высокой концентрации соли) — в четырехцепочечной [1]; при этом поли(А) окрашивается в сиреневый цвет, поли(У) и поли(С) — в розовый, а поли(Г) — в фиолетовый [7]. Окрашивание в разные цвета свидетельствует о том, что ТГ взаимодействует с гомополимерами по-разному.

Для того чтобы выяснить, как ТГ взаимодействует с разными формами поли(Г) и других гомополимеров, в настоящей работе гели окрашивали ТГ, растворенным в тех же буферных растворах, в которых проводили электрофорез, т. е. при разных рН и ионных силах. Окрашенные гели сканировали на спектрофотометре «Shimadzu», записывая электронные спектры поглощения в разных местах геля. Полученные результаты представлены на рис. 5 и суммированы в таблице.

$\lambda_{\max}$  спектров поглощения гомополирибонуклеотидов, окрашенных толуидиновым голубым в агарозных гелях

Гомополимер	Форма	$\lambda_{\max}$ , нм*	Номер спектра на рис. 5
Поли(А)	Одноцепочечный	577	Не приведен
	Двухцепочечный	577	1
Поли(Г)	Одноцепочечный	570	2
	Четырехцепочечный	548	3
Поли(С)	Четырехцепочечный	547	4
Поли(У)	Одноцепочечный	532	5
Поли(С)	Одноцепочечный	511	6

\*Ошибка в определении  $\lambda_{\max}$  для одного и того же гомополимера от эксперимента к эксперименту составляет не более  $\pm 3$  нм.

Электронный спектр поглощения быстрее мигрирующей формы поли(Г), окрашенного ТГ (рис. 5, спектр 2), снят в точке, показанной стрелкой на рис. 3, Б. Соответствующий спектр медленнее мигрирующей формы снят в максимуме зоны А (рис. 2). Как видно из рис. 5, Б, и таблицы, спектры значительно отличаются друг от друга:  $\lambda_{\max}$  спектра 2 смещена примерно на 20 нм в длинноволновую область по сравнению с  $\lambda_{\max}$  спектра 3. Эти данные еще раз подтверждают наш вывод о том, что при низких ионных силах поли(Г) сосуществует в двух разных формах.

Сравнение спектров поли(Г), окрашенного ТГ, со спектрами других окрашенных гомополимеров показывает, что спектр одноцепочечного поли(Г), связанного с ТГ (спектр 2), наиболее близок к спектру окрашенного поли(А) (спектр 1),  $\lambda_{\max}$  которого в наименьшей степени сдвинута в коротковолновую область по сравнению с  $\lambda_{\max}$  свободного красителя, спектр которого представлен на рис. 5, А. Следует отметить, что спектры ТГ в видимой области в  $H_2O$  и в растворах, используемых в данной работе, имеют одинаковую форму.

Поли(А) при слабокислых рН переходит в две различные двухспиральные формы [9, 10]. Однако спектры окрашенного поли(А), снятые после электрофореза в щелочном и кислом буферных растворах, не отличаются друг от друга в пределах ошибки эксперимента (спектр 1 на рис. 5, В, соответствует двухцепочечной форме поли(А)). По-видимому, этот краситель взаимодействует с одно- и двухцепочечными формами поли(А) одинаковым образом.

$\lambda_{\max}$  спектра поглощения четырехцепочечной формы поли(Г), связанного с ТГ (рис. 5, спектр 3), близка к  $\lambda_{\max}$  спектра поли(С), окрашенного ТГ после электрофореза в кислой среде (спектр 4), однако формы спектров различны. Конформация поли(С), как и в случае поли(А), изменяется при протонировании полимера, при этом одноцепочечный поли(С) переходит в две формы: в двухспиральную [11, 12] и, как мы недавно показали [20], — в четырехцепочечную форму, так называемый *i*-мотив. По нашим предварительным данным, при низких ионных силах *i*-мотив значительно преобладает, и спектр 4, показанный на рис. 5, относится, по всей видимости, к четырехцепочечной форме поли(С).

Таким образом, спектр одноцепочечной формы поли(Г) близок к спектрам одноцепочечной и двухцепочечной форм другого пуринового гомополимера — поли(А), а спектр четырехцепочечной формы поли(Г) близок к спектру четырехцепочечной формы поли(С).

Спектры одноцепочечных форм пиримидиновых гомополимеров поли(У) (спектр 5) и поли(С) (спектр 6) близки между собой, но заметно отличаются от спектров других гомополимеров. Их  $\lambda_{\max}$  в наибольшей степени сдвинуты в коротковолновую область по сравнению с  $\lambda_{\max}$  свободного ТГ. В целом разница в  $\lambda_{\max}$  для поли(А) и одноцепочечного поли(С) составляет примерно 70 нм.

Окрашенные зоны всех гомополирибонуклеотидов и их форм, представленных на рис. 5, отличаются по цвету визуально: поли(А) выглядит сиренево-голубым, поли(Г) и *i*-форма поли(С) имеют разные оттенки сиреневого и фиолетового цветов, а поли(У) и одноцепочечный поли(С) — разные оттенки розового цвета. В восприятие цвета, по-видимому, вносит вклад также рассеяние света на агарозном геле, поскольку комплексы ТГ с гомополимерами в гелях и растворах окрашиваются по-разному.

В частности, согласно нашим предварительным исследованиям, величины  $\lambda_{\max}$  спектров поглощения ТГ в растворе в присутствии щелочной и кислых форм поли(С) близки к соответствующим величинам  $\lambda_{\max}$  в агарозных гелях, но растворы полимера в присутствии ТГ при разных рН имеют лишь разные оттенки сиреневого цвета, а цвет гелей при переходе от кислых форм поли(С) к щелочной меняется с сиреневого на розовый.

Насколько нам известно, взаимодействие гомополирибонуклеотидов с ТГ ранее не изучали, однако были исследованы взаимодействия поли(А) с другими катионными красителями планарной структуры — метиленовым синим [21] и акридиновым оранжевым [22, 23]. Авторы указанных работ показали, что красители связываются с поли(А) разными способами в зависимости от условий эксперимента и формы полимера. К ним относятся внешнее электростатическое связывание димеров красителя с фосфатными группами, интеркаляция между основаниями, интеркаляция между парами оснований как изолированных мономеров красителя, так и взаимодействующих между собой на соседних местах связывания, а также связывание с полимером полуинтеркалированных димеров красителя.

Учитывая разнообразие спектров ТГ с разными гомополимерами и их формами, можно предположить, что краситель взаимодействует с поли(А), поли(С), поли(У) и поли(Г) также разными способами, включающими, возможно, в отдельных случаях образование водородных связей. Изучение механизмов этих взаимодействий составляет предмет наших дальнейших исследований.

**Выводы.** Зависимость конформации поли(Г) от концентрации моновалентных катионов была ранее исследована фактически лишь в двух работах: методом иммунологии [17] и методом КРС [18]. Результаты наших электрофоретических исследований находятся в соответствии с результатами работы [18]. Мы показали, что в отсутствие ионов двухвалентных металлов конформационный переход поли(Г) из одноцепочечной формы в четырехцепочечную завершается при  $I \sim 14$  мМ; при  $I = 10,2$  мМ в этой форме находятся  $94 \pm 2$  % макромолекул. Кроме того, нами впервые выявлено, что ТГ по-разному взаимодействует не только с различными гомополирибонуклеотидами [7], но и с разными формами этих полимеров, что может являться простым методом их визуальной идентификации. Электронный спектр поглощения одноцепочечной формы поли(Г), окрашенного ТГ, близок к спектрам поглощения одно- и двухцепочечных форм поли(А), связанных с этим красителем, а соответствующий спектр четырехцепочечной формы поли(Г) — к спектру четырехцепочечной формы поли(С).

В заключение авторы выражают благодарность Н. В. Литовченко за техническую помощь.

*M. I. Zarudnaya, A. V. Stepanyugin, A. L. Potyahaylo, D. M. Hovorun*

Electrophoretic study of conformational transitions in poly(G) as a function of monovalent cations

#### Summary

*Conformational transitions in poly(G) as a function of salt concentration has been studied first by the method of electrophoresis. It was shown that only one band of polymer is observed at concentration of monovalent cations  $> 10$  mM. This band corresponds to the four-stranded form of poly(G). At lower salt concentration two overlapping bands are observed. The band with lower electrophoretic mobility corresponds to four-stranded form of polymer and the band with higher mobility corresponds to single-stranded form. Electronic absorption spectrums of several homopolyribo-nucleotides after their staining with toluidine blue in agarose gels have been presented. It was discovered that the shape of spectrum depends both on polymer and its form. The  $\Delta\lambda_{\max}$  of absorption spectrums of four-stranded and single-stranded forms of poly(G) is about 20 nm.*

*Key words: poly(G), conformational transitions of homopolyribo-nucleotides, electrophoresis, toluidine blue, electronic absorption spectrums.*

*M. I. Zarudna, A. V. Stepanyugin, A. L. Potyahaylo, D. M. Hovorun*

Електрофоретичне дослідження конформаційних переходів у полі(Г) під дією моновалентних катіонів

#### Резюме

*Вперше методом електрофорезу досліджено конформаційні переходи в полі(Г) під дією солі. Показано, що при концентрації моновалентних катіонів  $> 10$  мМ спостерігається тільки одна зона полімеру, яка відповідає його чотирьохланцюговій формі; при нижчих концентраціях солі визначаються дві зони, що перекриваються. Повільніше мігруюча зона відповідає чотирьохланцюговій формі полі(Г), а швидше мігруюча — одноланцюговій. Наведено електронні спектри поглинання низки гомополирибонуклеотидів, забарвлених толуїдиновим блакитним (ТБ) в агарозних гелях. Показано, що форма спектра залежить як від гомополімеру, так і від його конформації.  $\Delta\lambda_{\max}$  спектрів поглинання ТБ у комплексі з одно- і чотирьохланцюговою формами полі(Г) складає близько 20 нм.*

*Ключові слова: полі(Г), конформаційні переходи гомополирибонуклеотидів, електрофорез, толуїдиновий блакитний, електронні спектри поглинання.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зарудная М. И., Говорун Д. Н. Самоассоциаты гомополимерных трактов клеточных РНК: физические механизмы образования и функционирования // Физика жизни.—1999.—7, № 2.—С. 38—52.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
3. Zarudnaya M. I., Potyahaylo A. L., Kolomiets I. M., Hovorun D. M. Auxiliary elements of mammalian pre-mRNAs polyadenylation signals // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 6.—С. 500—517.
4. Matunis M. J., Xing J., Dreyfuss G. The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization // Nucl. Acids Res.—1994.—22.—Р. 1059—1067.
5. Gwack Y., Kim D. W., Han J. H., Choe J. Characterization of

- RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1996.—225.—P. 654—659.
6. Achsel T., Stark H., Lührmann R. The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—98.—P. 3685—3689.
  7. Зарудная М. И., Желтовский Н. В. Определение констант связывания гомополирибонуклеотидов с производным лизина методом электрофореза в агарозных гелях // *Молекуляр. биология.*—1989.—23, № 1.—С. 215—224.
  8. Зарудная М. И., Желтовский Н. В. Исследование взаимодействия гомополирибонуклеотидов с дикатионом эфира лизина методом аффинного электрофореза // *Молекуляр. биология.*—1992.—26, № 1.—С. 110—117.
  9. Зарудная М. И., Желтовский Н. В. Электрофоретическое исследование конформационных переходов в поли(А) при кислых рН // *Молекуляр. биология.*—1995.—29, № 5.—С. 1040—1047.
  10. Зарудная М. И. Исследование конформационных переходов в поли(А) методом буферной емкости // *Молекуляр. биология.*—1998.—32, № 3.—С. 508—514.
  11. Зарудная М. И., Потягайло А. Л., Говорун Д. Н. Конформационные переходы поли(С) и поли(дС): исследование методом протонной буферной емкости // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 6.—С. 495—504.
  12. Zardnaya M. I., Samijlenko S. P., Potyahaylo A. L., Hovorun D. M. Structural transitions in polycytidylic acid: proton buffer capacity data // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*—2002.—21.—P. 125—137.
  13. Fresco J. R., Massoulié J. Polynucleotides. V. Helix-coil transition of polyriboguanilyc acid // *J. Am. Chem. Soc.*—1963.—85.—P. 1352—1353.
  14. Pochan F., Michelson A. M. Polynucleotides. VI. Interaction between polyguanylic acid and polycytidylic acid // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1965.—53.—P. 1425—1430.
  15. Лесник Е. А., Кочкина И. М., Тихоненко А. С., Варшавский Я. М. Структура полирибогуаниловой кислоты в растворе // *Молекуляр. биология.*—1980.—14, № 4.—С. 820—829.
  16. Лесник Е. А., Маслова Р. Н., Варшавский Я. М. Исследование влияния ионной силы и температуры на структурное состояние полирибогуаниловой кислоты в растворе методом кинетики  $^1\text{H} \rightarrow ^3\text{H}$ -обмена // *Молекуляр. биология.*—1981.—15, № 1.—С. 161—166.
  17. Souleil C., Panijel J. Immunochemistry of polyribonucleotides. Study of polyriboinosinic and polyriboquanylic acids // *Biochemistry.*—1968.—7.—P. 7—13.
  18. Rice J., Lafleur L., Medeiros G. C., Thomas G. J., Jr. Raman studies of nucleic acids. IX: a salt-induced structural transition in poly(rG) // *J. Raman Spectrosc.*—1973.—1.—P. 207—215.
  19. Mergny J.-L., Cian A. D., Ghelab A., Sacca B., Lacroix L. Kinetics of tetramolecular quadruplexes // *Nucl. Acids Res.*—2005.—33.—P. 81—94.
  20. Зарудная М. И., Степанюгин А. В., Потягайло А. Л., Говорун Д. Н. Исследование конформационных переходов в гомополирибонуклеотидах методом электрофореза // *IV З'їзд Укр. біофіз. тов-ва: Тези доповідей.*—Донецьк, 2006.—С. 295—296.
  21. Antony T., Atreyi M., Rao M. V. R. Spectroscopic studies on the binding of methylene blue to poly(riboadenylic acid) // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1993.—11.—P. 067—081.
  22. Imae T., Hayashi S., Ikeda S. Interaction between acridine orange and polyriboadenylic acid // *Int. J. Biol. Macromol.*—1981.—3.—P. 259—266.
  23. Imae T., Hayashi S., Ikeda S. Calculation of induced circular dichroism of acridine orange-poly(riboadenylic acid) complexes and conformation of their structure // *Macromolecules.*—1987.—20.—P. 589—597.

УДК 577.323.7

Надійшла до редакції 02.02.07