



# Структура и функция биополимеров

УДК 577.32

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДАМИ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И СВЕРХВЫСОКОЧАСТОТНОЙ ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ

М. А. Семенов, В. А. Кашпур, Т. В. Больбух, В. Я. Малеев

**Введение.** В работах [1, 2] проведено изучение гидратации увлажненных образцов мононуклеотидов методами гравиметрии и калориметрии. Однако полученные данные не дают информации о распределении молекул воды по гидратно-активным группам нуклеотидов и не позволяют судить о степени их гидратации в растворе, что необходимо для выяснения роли воды в стабилизации вторичной структуры нуклеиновых кислот. Кроме того, отсутствие этих сведений не позволяет провести сопоставления с результатами теоретического исследования гидратации компонентов нуклеиновых кислот [3, 4].

В связи с этим для определения степени гидратации (число молекул связанной воды на молекулу растворенного вещества) нуклеотидов и нуклеозидов проведены измерения диэлектрических свойств водных растворов АМФ, ТМФ и тимидина при длине волны 7,6 мм. Для ответа на вопрос, с какими гидратно-активными центрами связываются молекулы воды, исследованы также влажные пленки этих веществ методами ИК-спектроскопии и пьезогравиметрии.

**Материалы и методы.** В работе использовали АМФNa<sub>2</sub>, ТМФK<sub>2</sub> и тимидин производства фирм «Reanal» (ВНР), «Calbiochem» (США) и «Fluka AG» (Швейцария). Аморфные тонкие однородные пленки препаратов готовили на флюоритовых подложках из растворов с концентрацией 0,3 %. Необходимая влажность в кюветках достигалась с помощью насыщенных растворов солей. Изотермы гидратации получены методом кварцевого резонатора [5].

Суммарную степень гидратации образцов рассчитывали на основании измерения комплексной диэлектрической проницаемости, значения которой находили с помощью ранее описанного дифференциального диэлектрометрического метода [6]. Необходимые для определения степени гидратации этим методом значения удельных парциальных объемов и величин электропроводности исследуемых образцов в растворе получали методами пикнометрии и кондуктометрии на переменном токе (частота 10 кГц). При этом из суммарного значения степени гидратации солей нуклеотидов вычитали число молекул воды, связанных с ионами Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> (6 молекул воды на каждый ион).

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1, а, б показаны ИК-спектры поглощения аморфных пленок тимидина в D<sub>2</sub>O и H<sub>2</sub>O при увлажнении от 0 до 32 % относительной влажности (ОВ). Видно, что только интенсивности полос поглощения 1630 и 1664 см<sup>-1</sup> тимина, связанных с колебаниями C=N и C<sub>4</sub>=O<sub>4</sub>-групп соответственно, увеличиваются с ростом ОВ, что свидетельствует о гидратации этих групп. При дальнейшем увлажнении аморфной пленки до 44 % ОВ происходит ее кристаллизация, как показано на рис. 1, кривая 3. Это обстоятельство

не позволило определить интервал ОВ, в котором гидратируется рибоза, а также уровень гидратации тимидина. В то же время диэлектрические измерения тимидина в растворе (при концентрации 2 % данный нуклеозид находится, как показывают данные осмометрии [7], почти полностью в мономерной форме) позволили определить, что с ним связываются три молекулы воды. Эти молекулы могут связываться с гидратно-активными центрами как тимина, так и рибозы.

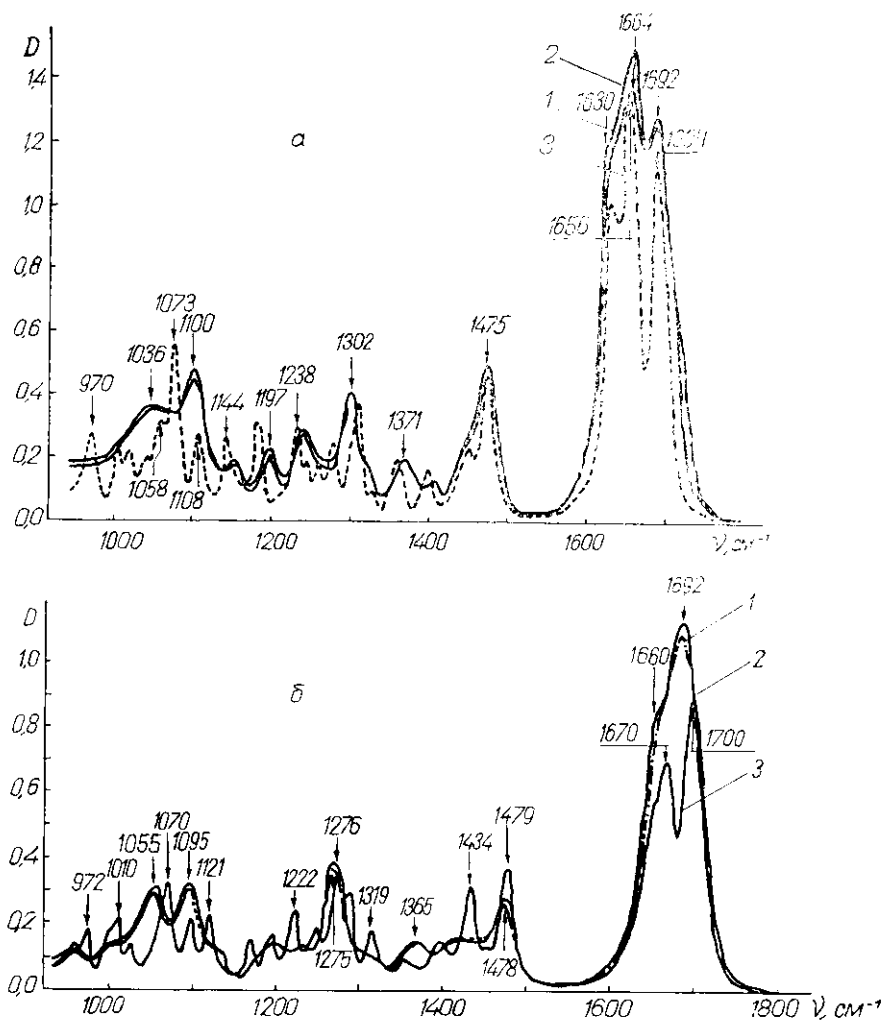


Рис. 1. ИК-спектры поглощения пленок тимидина в  $D_2O$  (а) и  $H_2O$  (б) при различных ОВ: 1 — 0; 2 — 32; 3 — 44 %.

Fig. 1. IR-spectra of amorphous thymidine films: deuterated (а) and undeuterated (б) at different r. h.: 1 — 0; 2 — 32; 3 — 44 %.

Для выяснения роли фосфатных групп в процессе гидратации нуклеотидов изучены аморфные пленки АМФ и ТМФ при разной влажности методом ИК-спектроскопии. Как видно из рис. 2, а, б, на котором приведены ИК-спектры поглощения дейтерированных и недейтерированных пленок ТМФ, в интервале влажности 0—64 % происходит возрастание интенсивности полос поглощения, отвечающих колебаниям групп тимина  $C_2=O_2$  ( $1690\text{ см}^{-1}$ ),  $C_4=O_4$  ( $1662\text{ см}^{-1}$ ),  $N_1C_2+C_2N_3$  ( $1472\text{ см}^{-1}$ ); рибозы  $C-O$  ( $973\text{ см}^{-1}$ ) и фосфата  $PO_2^-$  ( $1090\text{ см}^{-1}$ ). Из анализа построенных кривых зависимостей интенсивностей и частот от числа сорбированных молекул воды ( $n$ ) для этих ИК-полос поглощения найдено, что с ТМФ связано восемь молекул воды.

Степень гидратации этого же нуклеотида в растворе, определенная диэлектрическим методом, составляет семь молекул воды, что согласуется в пределах ошибки эксперимента с данными ИК-спектроскопии при 64 %.

Учитывая найденную степень гидратации тимидина и допуская, что гидратация нуклеотида является суммой гидратаций нуклеозида и

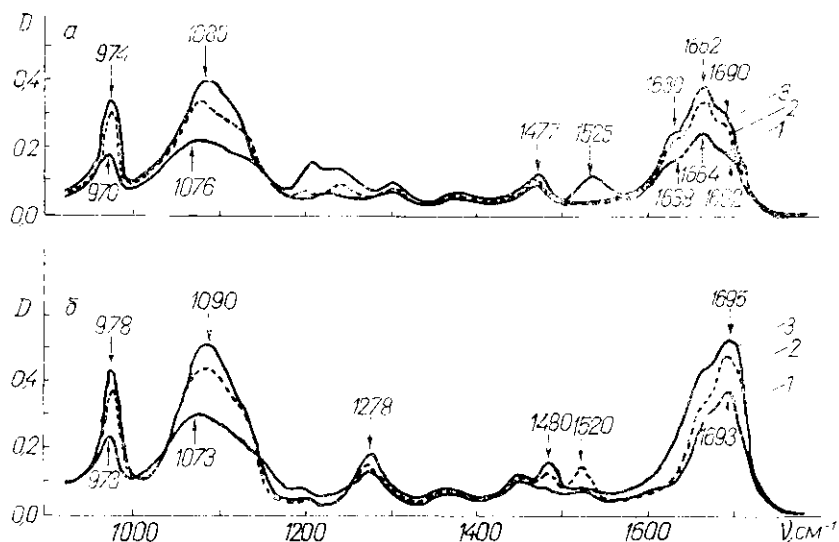


Рис. 2. ИК-спектры поглощения пленок ТМФ в  $D_2O$  (а) и  $H_2O$  (б) при разных ОВ: 1 — 0; 2 — 32; 3 — 64 %.

Fig. 2. IR-spectra of TMP films: deuterated (a) and undeuterated (b) at different r. h.: 1 — 0; 2 — 32; 3 — 64 %.

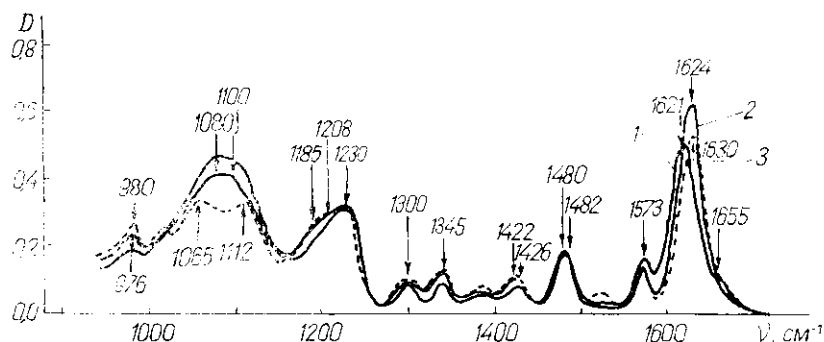


Рис. 3. ИК-спектры поглощения пленки АМФ в  $D_2O$  при разных ОВ: 1 — 0; 2 — 44; 3 — 56 %.

Fig. 3. IR-spectra of deuterated AMP films at different r. h.: 1 — 0; 2 — 44; 3 — 56 %.

фосфатной группы, можно сделать вывод, что с фосфатной группой связано 3—4 молекулы воды.

Аналогичные диэлектрические измерения позволяют оценить степень гидратации для АМФ, как равную 10 молекулам воды. При концентрации АМФ, равной 1,44 %, мономерная форма в растворе является преимущественной и составляет 66 % [8].

Как и в случае ТМФ, для аморфных пленок АМФ методом ИК-спектроскопии был проведен аналогичный анализ. На рис. 3 показан спектр пленки АМФ в  $D_2O$  при различных относительных влажностях. Как видно из рис. 3, в интервале влажности 0—44 % полосы поглощения фосфата ( $1103 \text{ см}^{-1}$ ), рибозы ( $979 \text{ см}^{-1}$ ) и аденина ( $1621 \text{ см}^{-1}$ ) увеличиваются по интенсивности и претерпевают низкочастотные сдвиги, что свидетельствует об их гидратации. В интервале влажности 44—

76 % полоса аденина при  $1621 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебанию группы  $\text{C}=\text{N}$ , уменьшается по интенсивности и сдвигается в «голубую» область до  $1630 \text{ см}^{-1}$  (рис. 4, а). Такой же эффект для этого колебания наблюдается при спирализации полиА и полиА·полиУ [9]. Поэтому надо полагать, что при этих влажностях в пленке АМФ происходит стопкообразование адениновых колец, как в полинуклеотидах. Возможно, что при этом происходит частичная дегидратация адениновых остатков. Однако разделить эти вклады в настоящее время трудно.

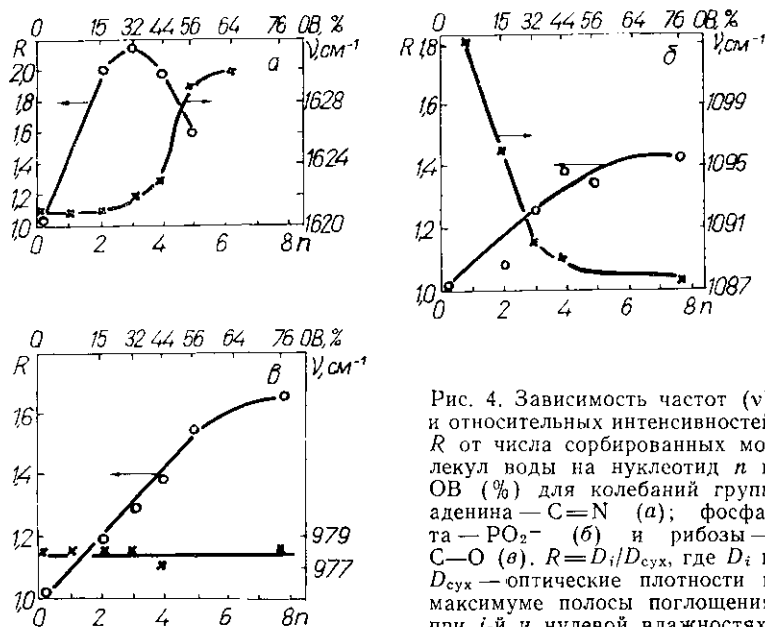


Рис. 4. Зависимость частот ( $\nu$ ) и относительных интенсивностей  $R$  от числа сорбированных молекул воды на нуклеотид  $n$  и ОВ (%) для колебаний групп аденина —  $\text{C}=\text{N}$  (а); фосфата —  $\text{PO}_2^-$  (б) и рибозы —  $\text{C}-\text{O}$  (в) ( $R$  is the ratio of  $D_i/D_{\text{dry}}$ , where  $D_i$  и  $D_{\text{dry}}$  — оптические плотности в максимуме полосы поглощения при  $i$ -й и нулевой влажностях).

Fig. 4. Plots of frequencies ( $\nu$ ) and relative intensities ( $R$ ) versus the amount of sorbed water molecules per nucleotide ( $n$ ) and r.h. (%) for vibration groups: adenine —  $\text{C}=\text{N}$  (a); phosphate —  $\text{PO}_2^-$  (б) and ribose —  $\text{C}-\text{O}$  (в) ( $R$  is the ratio of  $D_i/D_{\text{dry}}$ , where  $D_i$  and  $D_{\text{dry}}$  are the maximum absorption optical density values at the  $i$ th and zero humidities, respectively).

На рис. 4, б, в приведены зависимости частоты  $\nu$  и относительной интенсивности  $R$  от числа  $n$  или ОВ для углеводнофосфатных групп. Наблюдаемый рост интенсивностей вплоть до 76 % ОВ свидетельствует о гидратации фосфатов и рибозы. Однако при ОВ больше 76 % происходит разрушение пленки, поэтому степень гидратации для АМФ по данным ИК-спектроскопии установить не представляется возможным. Можно только отметить, что это значение больше восьми молекул воды на моль АМФ, что согласуется с диэлектрическими измерениями. Поэтому можно считать, что гидратация АМФ близка к 10 молекулам воды, а, следовательно, на адениновый остаток приходится 4—5 молекул воды.

Таким образом, сочетание СВЧ-диэлектromетрии и ИК-спектроскопии для исследования гидратации АМФ, ТМФ и тимидина позволило определить суммарную гидратацию этих веществ в растворе, найти наиболее вероятные центры гидратации ( $\text{C}=\text{N}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{C}_4=\text{O}_4$ ,  $\text{C}_2=\text{O}_2$ ,  $\text{C}-\text{O}$ ,  $\text{PO}_2-\text{Na}^+$ ) и на основании этих данных распределить молекулы связанной воды на азотистых основаниях, углеводах и фосфатных группах.

STUDY ON HYDRATION OF NUCLEIC ACID COMPONENTS  
BY IR-SPECTROSCOPY AND SHF-DIELECTROMETRY

M. A. Semenov, V. A. Kashpur, T. V. Bolbukh, V. Ya. Maleev

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

Summary

Dielectric permittivity and infrared spectra of nucleic acids components have been measured to elucidate the role of water in the stabilization of DNA double helical structure. The centres and degrees of hydration of adenine, thymine, ribose and phosphate groups are determined.

1. Falk B. M. Hydration of purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides // Can. J. Chem.—1965.—43, N 1.— P. 314—321.
2. Гидратация нуклеотидов, полинуклеотидов и природных ДНК / Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили, Г. Ш. Джапаридзе и др. // Конформационные изменения биополимеров в растворах: Тез. докл. V совещания по конформационным изменениям биополимеров в растворах.— Тбилиси: Мецниереба, 1980.— С. 42.
3. Данилов В. И., Шестопалова А. В. Изучение комплексов нуклеотидных оснований и Уотсон-Криковских пар с молекулой воды: плоские и пространственные конфигурации // Молекуляр. генетика и биофизика.— Киев: Вища школа, 1984.— Вып. 9.— С. 47—54.
4. Poltev V. I., Grokhlina T. I., Malenkov G. G. Hydration of nucleic acid bases studied using novel atom-atom potential functions // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1984.—2, N 2.— P. 413—429.
5. Больбух Т. В., Семенов М. А. Изотермы гидратации полинуклеотидов // Биофизика.—1985.—30, № 3.— С. 409—413.
6. Кашпур В. А., Малеев В. Я., Щеголева Т. Ю. Исследование гидратации глобулярных белков дифференциальным диэлектрометрическим методом // Молекуляр. биология.—1976.—10, № 3.— С. 568—575.
7. Osmometric studies on self-association of pyrimidines in aqueous solutions: evidence for involvement of hydrophobic interactions / E. Plesiewicz, E. Stepien, K. Bolewska, K. L. Wierzchowski // Biophys. Chem.—1976.—4, N 2.— P. 131—141.
8. Петров А. И., Сухоруков Б. И. Исследование межмолекулярных взаимодействий и самоорганизация адениновых нуклеотидов методом спиновых меток // Молекуляр. биология.—1980.—14, № 2.— С. 439—447.
9. Семенов М. А., Больбух Т. В., Малеев В. Я. Исследование гидратации двухспирального комплекса полнА-полиУ методами ИК-спектроскопии и пьезограмметрии // Биофизика.—1985.—30, № 4.— С. 571—577.

Ин-т радиофизики и электроники АН УССР,  
Харьков

Получено 11.11.85

УДК 577.217.53

**АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКОЙ СХЕМЫ  
СТАДИИ ЭЛОНГАЦИИ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В РАМКАХ  
ГИПОТЕЗЫ О СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ  
КОДОН-АНТИКОДОНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НА РИБОСОМЕ.  
1. СКОРОСТЬ ЭЛОНГАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ**

**А. П. Потапов, Б. Н. Гольдштейн, С. Р. Сайфуллин, А. В. Ельская**

Матричный синтез белка на рибосомах основан на кодон-антикодонных взаимодействиях, которые определяют отбор соответствующей аминоацил-тРНК и по завершении трансептидации влияют на эффективность транслокации новообразованной пептидил-тРНК с прочтенным кодоном мРНК из А- в Р-центр рибосомы [1]. Характерной особенностью кодон-антикодонных взаимодействий является малое число участвующих в них нуклеотидов, в силу чего эти взаимодействия как таковые являются сравнительно слабыми и малоспецифичными [2—