

20. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— 74, N 2.— P. 560—564.
21. Birnboim H. C., Doly J. A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1513—1523.
22. Lyamichev V. I., Panyutin I. G., Frank-Kamenetskii M. D. Evidence of cruciform structures in superhelical DNA provided by two-dimensional gel electrophoresis // FEBS Lett.— 1983.— 153, N 2.— P. 298—302.
23. Panyutin I., Lyamichev V., Mirkin S. A structural transition in $d(AT)_n \cdot d(AT)_n$ inserts within superhelical DNA // J. Biomol. Struct. and Dyn.— 1985.— 2, N 6.— P. 1221—1234.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва
 Ин-т цитологии и генетики
 Сиб. отделения АН СССР, Новосибирск
 ВНИИгенетика, Москва

Получено 22.07.86

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК ВО ВЛАЖНЫХ ПЛЕНКАХ МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ *

М. А. Семенов, Т. В. Больбух

Введение. Изучение методом инфракрасной (ИК) спектроскопии влажных пленок полинуклеотидов и ДНК позволило получить сведения об их конформационном состоянии, о местах связывания молекул воды и влиянии гидратации на устойчивость спиральных структур [1—4]. Спектральные параметры ИК-полос поглощения (частоты, интенсивности, полуширины) нуклеиновых кислот и воды весьма чувствительны к внутри- и межмолекулярным взаимодействиям. Это обстоятельство позволило использовать метод ИК-спектроскопии для изучения конформации и структуры гидратной оболочки нуклеиновой кислоты в комплексе биомолекула — краситель, что необходимо для понимания механизмов взаимодействия и функционирования гидратной воды нуклеиновых кислот с биологически активными веществами.

В данной работе было проведено исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК в пленках при различных относительных влажностях (ОВ) методом ИК-спектроскопии.

Известно, что бромистый этидий образует с ДНК довольно устойчивый комплекс [5—8]. В настоящее время особенно после рентгеноструктурного изучения с атомным разрешением кристаллов комплексов динуклеозидфосфатов А—У и Г—Ц с бромистым этидием [9, 10] считается, что фенантридиновое кольцо бромистого этидия интеркалирует между плоскостями оснований, изменяя при этом гликозидные углы, конформацию дезоксирибозы, межплоскостные расстояния и другие структурные параметры ДНК [5, 11]. При этом, по-видимому, должно претерпеть изменение водно-ионное окружение, особенно в местах интеркалирования фенантридинового кольца. Иначе говоря, свойства гидратно активных групп азотистых оснований должны существенно измениться. Однако такие сведения почти отсутствуют, что затрудняет построение достаточно реальных моделей гидратного комплекса бромистый этидий — ДНК. Кроме того, до сих пор не выяснен вопрос о существовании в данном комплексе внекольцевых взаимодействий колебательных моментов перехода, которые были обнаружены в спиральных полинуклеотидах [12] и нативной ДНК (нДНК) [13]. По-видимому, эти взаимодействия в местах интеркалирования бромистого этидия должны существенно измениться.

* Представлена членом редколлегии В. И. Даниловым

Выяснению этих вопросов и посвящена настоящая работа. Предварительные результаты были сообщены нами ранее [14].

Материалы и методы. В работе использовали ДНК селезенки крупного рогатого скота, полученную в лаборатории Д. Ю. Ландо (Ин-т биоорг. химии АН БССР). Препараты ДНК имели гипохромный эффект при $\lambda=260$ нм не ниже 38 %, содержали меньше 1 % белка и 9 % ионов натрия и калия по отношению к сухому весу нуклеиновой кислоты. Использовали бромистый этидий фирмы «Serva» (ФРГ).

Комплексы ДНК с бромистым этидием готовили из их исходных растворов с соотношением Р/Д=4, где Р, Д — молярные концентрации фосфатов ДНК и бромистого этидия соответственно [15]. После лиофилизации готовили тонкие пленки, которые затем дейтерировали, увлажняли и проводили анализ их ИК-спектров аналогично [1].

Изотермы гидратации нДНК, бромистого этидия и комплекса ДНК — бромистый этидий были получены на установке, описанной в работе [16].

Результаты и обсуждение. Для выяснения влияния воды и бромистого этидия на ДНК были получены спектры пленок бромистого этидия, нДНК и ДНК с бромистым этидием в области $900-3800$ см^{-1} в дейтерированном и недейтерированном состояниях в интервале ОВ 0—98 % при 20°C . Сравнительный анализ проводили построением зависимостей частот и интенсивностей полос поглощения азотистых осно-

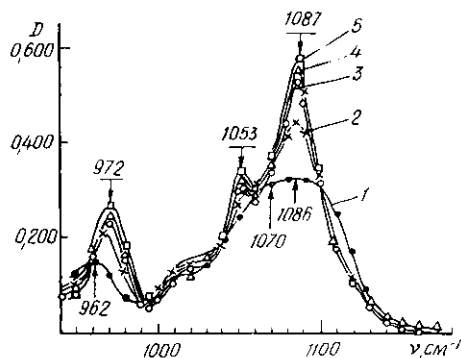


Рис. 1. Спектры поглощения пленок ДНК с бромистым этидием при ОВ 0 (1), 66 (2), 76 (3), 86 (4), 92 % (5)

Fig. 1. IR-spectra of DNA films with ethidium bromide at different relative humidities: 1 — 0 %, 2 — 66 %, 3 — 76 %, 4 — 86 % and 5 — 92 %

ваний и сахарофосфатного остова от числа молекул воды на нуклеотид (n), как в работах [1, 2]. Интенсивность полос поглощения измеряли в относительных единицах $R = \frac{D_i}{D_{\text{сух}}}$, где D_i и $D_{\text{сух}}$ — оптические плотности в максимуме полос поглощения при i -й и нулевой ОВ ДНК соответственно.

Число молекул воды на нуклеотид, сорбированной на нДНК в комплексе, рассчитывали с помощью полученных изотерм гидратации. Область поглощения сахарофосфатного остова ДНК. На рис. 1 приведены спектры пленок ДНК с бромистым этидием при различных ОВ в области $940-1170$ см^{-1} поглощения сахарофосфатного остова ДНК. Видно, что при ОВ больше 60 %, как и в случае нДНК, появляется характерная для спиральной структуры полоса поглощения при 1053 см^{-1} [2], ответственная в основном за колебание С—О-групп дезоксирибозы [17]. Это свидетельствует о том, что ДНК в комплексе с бромистым этидием при ОВ 60 % переходит в спиральную конформацию.

Из рис. 2 видно, что при отсутствии особенностей на частотных зависимостях на зависимостях интенсивностей имеются участки, характерные для А- и В-форм ДНК, как это и ранее было установлено для нДНК [2], однако уровень поглощения для ДНК с бромистым этидием ниже, чем в случае нДНК. Это связано, по-видимому, с тем, что бромистый этидий частично препятствует гидратации сахарофосфатного остова спиральной формы ДНК.

Область поглощения азотистых оснований. Для ДНК в комплексе в этой области спектра при увеличении ОВ или n обнаруживаются более существенные изменения по сравнению с областью поглощения сахарофосфатного остова. На рис. 3, а, б, приведены спектры пленок при различных ОВ для недейтерированных образцов нДНК, ДНК с бромистым этидием и спектр бромистого эти-

дия. Количество последнего в пленке соответствует его содержанию в пленке с ДНК. Видно, что вклад спектра бромистого этидия в спектр ДНК незначителен.

Известно, что при ОВ больше 56% у нДНК появляется высокочастотная полоса, которая при высоких влажностях смещается до

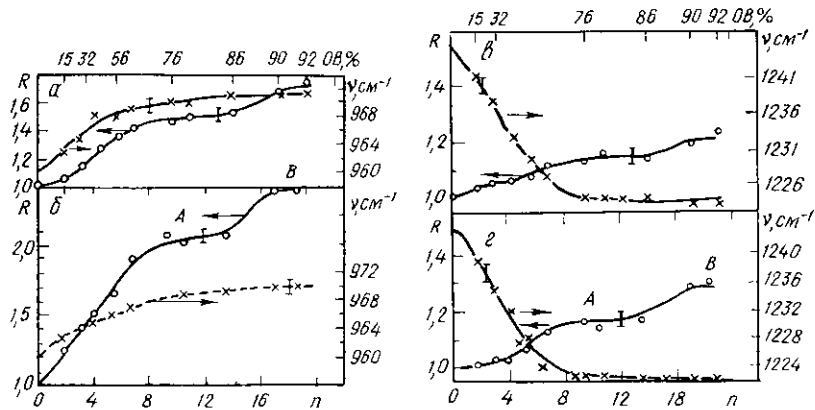


Рис. 2. Зависимость частот ν и интенсивностей R от числа молекул сорбированной воды на нуклеотид n для полос поглощения фосфатных групп PO_2^- ($\nu_{as}=1225 \text{ см}^{-1}$) и дезоксирибозы $\text{C}-\text{O}$ ($\nu=962 \text{ см}^{-1}$) ДНК с бромистым этидием (а, б) и нДНК (б, з)

Fig. 2. Plots of frequencies (ν) and relative intensities (R) vs. the amount of sorbed water molecules per nucleotide (n) for vibration groups: phosphate — PO_2^- ($\nu_{as}=1225 \text{ см}^{-1}$) and deoxyribose $\text{C}-\text{O}$ ($\nu=962 \text{ см}^{-1}$) for DNA with ethidium bromide (a, b) and for nDNA (b, z)

1712 см^{-1} ([1] и рис. 3, а). Обычно эту полосу связывают с появлением спиральной структуры ДНК, однако однозначное мнение по этому поводу в настоящее время отсутствует. Возможно, что за нее ответственно деформационное колебание

NH_2 -групп аденина, гуанина и цитозина, такая же полоса наблюдается в двухспиральном комплексе поли(А) [17], где отсутствует карбонильное поглощение. При увлажнении пленок ДНК с бромистым этидием эта полоса появляется, сме-

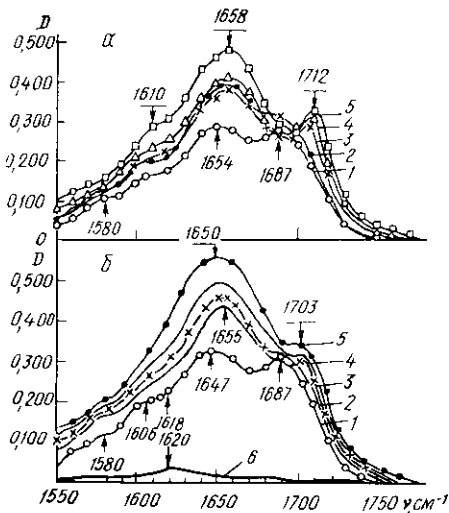


Рис. 3. Спектры поглощения пленок нДНК (а) и ДНК с бромистым этидием (б) при различных ОВ в H_2O — 0 (1), 65 (2), 76 (3), 86 (4), 92% (5); 6 — спектр пленки бромистого этидия

Fig. 3. IR-spectra of nDNA (a) and DNA films with ethidium bromide (b) at different relative humidities in H_2O : 1—0, 2—65, 3—76, 4—86, 5—92%, 6—is a spectrum of ethidium bromide film

щаяся только до 1703 см^{-1} (рис. 3, б). По-видимому, это связано с участием при спирализации ДНК одного атома водорода аминогруппы NH_2 в водородных связях уотсон — криковских пар, вследствие чего другой перекрывается гидрофобными группами (этильной и фенильной) бромистого этидия, что препятствует образованию водородной связи с молекулой воды. Это должно привести к уменьшению «голубого» сдвига полосы поглощения деформационного колебания NH_2 -группы по сравнению с такой же полосой для нДНК.

Интересные результаты получены при сравнительном анализе зависимостей частот и интенсивностей полос поглощения внутри- и внекольцевых колебаний азотистых оснований от ОВ или n для ДНК с бромистым этидием в дейтерированном состоянии. На рис. 4, а, б, приведены типичные спектры пленок нДНК и ДНК с бромистым этидием в дейтерированном состоянии при различных ОВ.

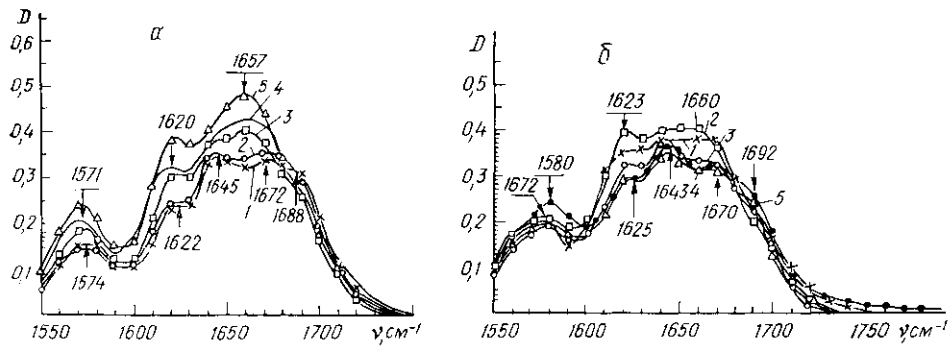


Рис. 4. Спектры поглощения пленок ДНК при различных ОВ в D_2O : нДНК (а—0 (1), 44 (2), 64 (3), 80,5 (4), 92 % (5)), ДНК с бромистым этидием (б—92 (1), 80 (2), 64 (3), 44 % (4))

Fig. 4. IR-spectra of DNA films at different relative humidities in D_2O for a) nDNA (1—0, 2—44, 3—64, 4—80.5, 5—92 %); б) DNA with ethidium bromide (1—92, 2—80, 3—64, 4—44 %)

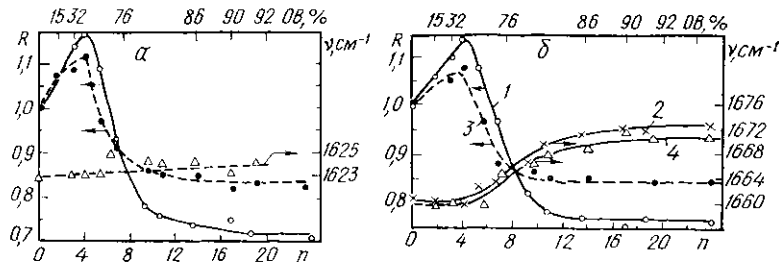


Рис. 5. Зависимости частот ν и интенсивностей R от числа сорбированных молекул воды n для полос поглощения ~ 1624 cm^{-1} (а) и ~ 1672 cm^{-1} (б): нДНК (1, 2); ДНК с бромистым этидием (3, 4)

Fig. 5. Plots of frequencies (ν) and relative intensities (R) vs the amount of sorbed water molecules (n) for the absorption bands ~ 1624 cm^{-1} (a) and ~ 1672 cm^{-1} (б): nDNA (1, 2), DNA with ethidium bromide (3, 4)

Хорошо видны различия в спектрах при увеличении ОВ. Рассмотрим более подробно зависимости ν и R от n для некоторых полос. На рис. 5, а, б, приведены эти зависимости для полос 1624 cm^{-1} внутрикольцевого колебания $C=N$ в основном аденина и 1672 cm^{-1} колебания $C_4=O_4$ -группы тимина. Видно, что в интервале ОВ 0—60 %, когда с ДНК связываются приблизительно пять молекул воды на нуклеотид, происходит увеличение интенсивности полос как для нДНК, так и для ДНК в комплексе. Это связано, как ранее было интерпретировано для нДНК [1], с гидратацией внутри- и внекольцевых связей азотистых оснований. При ОВ больше 56 % происходит резкое уменьшение интенсивности этих полос и высокочастотный сдвиг полосы карбонильного поглощения, свидетельствующие о том, что как нДНК, так и ДНК с бромистым этидием переходят в спиральную конформацию. Из рис. 5, б, также видно, что характер зависимости изменения частоты от n полосы 1672 cm^{-1} одинаков для обеих ДНК. Поскольку в эту полосу дают вклад в основном $C_4=O_4$ -группы тимина, то надо пола-

гать, что молекулы бромистого этидия не оказывают влияния на взаимодействия карбонильных колебаний. По-видимому, фенантридиновое кольцо бромистого этидия не интеркалирует в А — Т-богатые участки ДНК. Тем не менее уменьшение при низких влажностях интенсивности полос поглощения вне- и внутрикольцевых колебаний ДНК с бромистым этидием по сравнению с нДНК (рис. 5, а, б) свидетельствует об уменьшении гидратации азотистых оснований.

Кроме этого, при ОВ больше 76 % (рис. 5, а, б) происходит уменьшение на 35 % ИК-гипохромизма полос поглощения 1625 и 1672 см⁻¹

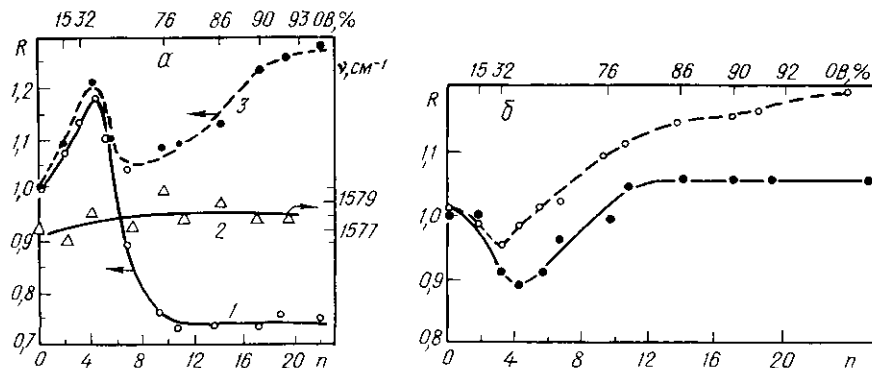


Рис. 6. Зависимость частот ν и интенсивностей R от числа сорбированных молекул воды n для полосы поглощения 1578 см⁻¹ (а) и поглощения в области ~1688 см⁻¹ (б): для нДНК (1, 2) и ДНК с бромистым этидием (3)

Fig. 6. Plots of frequencies (ν) and relative intensities (R) vs the amount of sorbed water molecules (n) for the absorption bands 1578 cm⁻¹ (a) and ~1688 cm⁻¹ (b), for nDNA (1, 2) and DNA with ethidium bromide (3)

для комплекса ДНК — бромистый этидий. Это подтверждает данные о том, что плоскости соседних азотистых оснований, очевидно, при спирализации ДНК не имеют такого перекрытия, как в нДНК. К такому же выводу пришел автор работы [6], в которой также изучался комплекс ДНК — бромистый этидий в пленке при различных ОВ.

Иной характер зависимости интенсивности от n или ОВ существует для полосы поглощения гуанина при 1578 см⁻¹, связанной с внутрикольцевыми колебаниями атомов N₂C₄—C₅C₄ и C₄C₅—C₄N₉ [17] и полосы в области 1688 см⁻¹, обусловленной колебаниями взаимодействующих карбониллов C₆=O₆ [12]. Как видно из рис. 6, а, в начале гидратации сорбируются до семи молекул воды, зависимость R от n для полосы 1578 см⁻¹ не отличается от таковой для полос 1625 см⁻¹ аденина и 1672 см⁻¹ тимина. Однако при дальнейшей сорбции воды ($n > 7$) при переходе ДНК в спиральную конформацию наблюдается в отличие от нДНК рост интенсивности полосы при 1578 см⁻¹ для комплекса ДНК — бромистый этидий. Поскольку эта полоса связана с колебаниями атомов гуанина, расположенных в малой бороздке ДНК, то, по-видимому, уже в начале спирализации (при $n = 7$) происходит интеркаляция фенантридинового кольца бромистого этидия в малой бороздке между Г — Ц-парами таким образом, что бром подходит к соответствующей связи и ее поляризует.

Это приводит к росту дипольного момента связи (μ), а следовательно, и интенсивности (I) ее полосы поглощения, так как $I \sim \left(\frac{\partial \mu}{\partial Q}\right)^2$, где Q — нормальная координата.

О том, что происходит интеркаляция бромистого этидия свидетельствует также зависимость R от n или ОВ при 1688 см⁻¹, в которую вносят вклад C₆=O₆-группы гуанина (рис. 6, б). Видно, что для комплекса ДНК — бромистый этидий интенсивность этого поглощения при ОВ, больших 92 %, ниже, чем у свободной ДНК. Это, быть может,

связано с уменьшением числа взаимодействующих колебаний карбонильных $C_6=O_6$ -групп вследствие интеркаляции бромистого этидия между этими осцилляторами.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что при низких ОВ (до 56 %) бромистый этидий не взаимодействует с азотистыми основаниями ДНК, но располагаясь на ее поверхности, оказывает дегидратирующее влияние на сахарофосфатный остов. В интервале ОВ 56—92 % происходит образование вторичной структуры ДНК, которое сопровождается интеркаляцией бромистого этидия преимущественно в Г—Ц-пары со стороны малой бороздки ДНК, и при ОВ, равной 92 %, заканчивается формирование гидратной оболочки комплекса ДНК—бромистый этидий. При этом в местах интеркаляции бромистого этидия искажается не только структура ДНК, но и ее гидратная оболочка.

THE COMPLEXING OF ETHIDIUM BROMIDE AND DNA IN MOIST FILMS AS REVEALED BY IR-SPECTROSCOPY

M. A. Semenov, T. V. Bolbukh

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

Summary

IR-spectroscopy is shown to be a tool in investigating the complexing of ethidium bromide and DNA moist films. The dependence of DNA backbone frequencies and intensities of absorption bands upon water content was analyzed. It is shown that at humidities higher than 56 % the DNA helix formation is accompanied by selective intercalation of ethidium bromide from the narrow groove side. This process alters the DNA structure and leads to a dehydration of nucleic base aminogroups. It is also found that the intercalation prevents from the dipole-dipole interactions between the carbonyl guanine groups.

1. Семенов М. А., Сухоручков Б. И., Малеев В. Я. Гидратируются ли азотистые основания в ДНК при низких влажностях? // Биофизика.— 1981.— 26, № 6.— С. 979—984.
2. Семенов М. А. ИК-спектроскопическое проявление гидратации ДНК // Молекуляр. генетика и биофизика.— Киев: Изд-во Киев. гос. ун-та, 1984.— С. 25—33.
3. Семенов М. А. Экспериментальное исследование энергетического вклада гидратации в стабилизацию спиральной структуры ДНК // Тез. докл. и стендовых сообщ. I Всесоюз. биофиз. съезда.— М., 1982.— Т. 1.— С. 57.
4. Семенов М. А., Бобчук Т. В., Малеев В. Я. Исследование гидратации двухспирального комплекса поли А·поли У методами ИК-спектроскопии и пьезограмметрии // Биофизика.— 1985.— 30, № 4.— С. 571—577.
5. Fuller W., Waring M. I. A molecular model for the interaction of ethidium bromide with deoxyribonucleic acids // Ber. Bunsenges. phys. Chem.— 1967.— 68, N 8.— P. 805—808.
6. Dougherty G. A single-beam microspectrophotometer suitable for investigating the linear dichroism of DNA-drug fibers // Anal. Biochem.— 1981.— 115, N 1.— P. 52—57.
7. Miller K. I., Brodzinsky R., Hall S. Interactions of molecules with nucleic acids. IV. Binding energies and conformations of acridine and phenanthridine compounds in the two principal and in several unconstrained dimer-duplex intercalation sites // Biopolymers.— 1980.— 19, N 11.— P. 2091—2122.
8. Neidle S., Berman H. M. X-ray crystallographic studies of nucleic acids and acid-drug complexes // Progr. Biophys. and Mol. Biol.— 1983.— 41.— P. 43—66.
9. Tsai Ch., Jain S. C., Sobell H. M. X-ray crystallographic visualization of drug-nucleic acid intercalative binding structure of an ethidium-dinucleotide monophosphate crystalline complex, ethidium, 5-iodouridylyl adenosine // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1975.— 72, N 2.— P. 628—632.
10. Jain S. C., Tsai Ch., Sobell H. M. Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. II. Structure of an ethidium dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium: 5-iodocytidylyl-(3'--5')-guanosine // J. Mol. Biol.— 1977.— 114, N 2.— P. 317—331.
11. Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. III. Unifying structural concepts in understanding drug-DNA interactions and their broader implications in understanding protein—DNA interactions / H. M. Sobell, Ch. Tsai, C. Jain, S. G. Gilbert // Ibid.— P. 333—365.
12. Semenov M. A., Bolbukh T. V. Carbonyl vibration resonance interactions of helical polynucleotides poly(dA)·poly(dT) and polyG·polyC // Stud. biophys.— 1984.— 102, N 3.— P. 215—220.

13. Семенов М. А., Больбух Т. В. Резонансные взаимодействия карбонильных колебаний в спиральных полинуклеотидах и ДНК // IV Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров: Тез. докл.— Харьков, 1981.— С. 162.
14. Семенов М. А., Больбух Т. В. ИК-спектроскопическое исследование комплексообразования этидия бромидом с ДНК во влажных пленках // Конформац. изм. биополимеров в растворах: Тез. докл. Всесоюз. конф.— Тбилиси, 1985.— С. 151.
15. Porumb H. The solution spectroscopy of drugs and the drug-nucleic acid interactions // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*— 1978.— 34.— P. 175—195.
16. Больбух Т. В., Семенов М. А. Изотермы гидратации полинуклеотидов // *Биофизика.*— 1985.— 30, № 3.— С. 409—413.
17. Lu K. C., Prohofsky E. W., Van Zandt L. L. Vibration modes of A-DNA, B-DNA and A-RNA. Backbones: an application of a green-function refinement procedure // *Biopolymers.*— 1977.— 16, N 11.— P. 2491—2506.
18. Bolbiukh T. V., Starikov E. B., Semenov M. A. The hydration of double-helical poly(2A) films studied by IR-spectroscopy and piezomicrobalance // *Stud. biophys.*— 1985.— 108, N 3.— P. 199—207.

Ин-т радиофизики и электрон. АН УССР,
Харьков

Получено 19.02.86

УДК 577.112

**ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ
КАТАЛАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*.
1. РАЗДЕЛЕНИЕ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ
РАСТВОРИМЫХ ПЕПТИДОВ**

**Э. А. Козлов, М. Т. Кириленко, Т. Л. Левитина,
Л. В. Гудкова, Р. Г. Дегтярь, Е. В. Солодова**

Введение. Ранее рентгеноструктурными исследованиями [1, 2], а также изучением аминокислотного состава и пептидных карт [3] было показано, что каталаза *P. vitale* состоит из четырех идентичных субъединиц с молекулярной массой 75 000—80 000. Каждая субъединица содержит примерно 650 аминокислотных остатков. Настоящее сообщение является первой публикацией по изучению первичной структуры каталазы *P. vitale*.

Исследование первичной структуры каталаз печени, эритроцитов быка [4] и человека [5] показало, что указанные ферменты составляют группу высокоомологичных белков: на 506 остатков аминокислот насчитываются 42 замены. Рентгеноструктурным исследованием показано, что каталаза *P. vitale* отличается от каталазы печени быка наличием дополнительного С-концевого домена, включающего около 150 остатков аминокислот [2]. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, можно предположить, что N-концевая часть (приблизительно 500 аминокислотных остатков) каталазы *P. vitale* гомологична по первичной структуре каталазам быка и человека. Изучая первичную структуру белков тел включений бакуловирусов [6—12], мы показали, что при гомологии выше 70 % для установления аминокислотной последовательности полипептидной цепи исследуемого белка достаточно выяснить строение триптических пептидов и сравнить их с первичной структурой эталонного белка [13]. Можно полагать, что изучение строения триптических пептидов каталазы гриба *P. vitale* даст возможность оценить степень гомологии этой каталазы и каталаз быка и человека, а в случае высокой степени гомологии — реконструировать первичную структуру фрагментов каталазы гриба.

В данном сообщении описаны методы и результаты выделения и очистки индивидуальных пептидов из растворимой фракции триптического гидролизата каталазы гриба *P. vitale*.