



УДК 539.199

© 2007

Академік НАН України Л. А. Булавін, С. Н. Волков, С. Ю. Кутовий,
С. М. Перепелиця

Спостереження іон-фосфатних коливань макромолекули ДНК

It is shown that, in the low-frequency Raman spectra of Cs-DNA, the mode of ion-phosphate vibrations exists. Together with the modes of H-bond stretching in base pairs, it forms the band near 100 cm^{-1} with intensity about twice as much than that in the spectra of Na-DNA. The mode of Na-DNA ion-phosphate vibrations is much lower in intensity and is located within a broad band near 180 cm^{-1} .

Стабільність структури молекули ДНК в природному середовищі зумовлена нейтралізацією негативно заряджених фосфатних груп остова подвійної спіралі протиіонами лужних металів [1]. Протиіони разом з фосфатними групами утворюють уздовж остова ДНК регулярну структуру, яку можна розглядати як іонну ґратку. Утворення та існування такої ґратки протиіонів і фосфатів остова повинно характеризуватися специфічними іон-фосфатними коливаннями. Метою даної роботи є експериментальне спостереження моди іон-фосфатних коливань в коливальних спектрах ДНК, що повинно бути підтвердженням існування іон-фосфатної ґратки.

Проведені раніше розрахунки низькочастотних коливальних спектрів [2–4] показали, що частота іон-фосфатних коливань, залежно від маси протиіону, може змінюватися в діапазоні від 90 до 250 cm^{-1} . Наявні експериментальні дані свідчать, що в цьому діапазоні коливального спектра нуклеїнових кислот існують моди, частоти яких істотно залежать від протиіонів, зокрема, мода, яка при збільшенні маси протиіонів змінюється від 150 до 95 cm^{-1} [5] і мода 170 cm^{-1} , інтенсивність якої залежить від концентрації протиіонів Na^+ [6]. Проте, окрім цих мод, в низькочастотному діапазоні спектра спостерігаються також коливання фосфатних груп та азотистих основ ДНК, пов'язані з розтягом водневих зв'язків та деформацією цукрового кільця [6–10]. Для експериментального виявлення моди іон-фосфатних коливань серед інших коливальних мод ДНК може бути використана залежність частоти коливань від маси протиіонів. В даній роботі досліджено спектри комбінаційного розсіяння молекули ДНК з легкими (Na^+) та важкими (Cs^+) протиіонами і визначено місце моди іон-фосфатних коливань в низькочастотному спектрі ДНК.

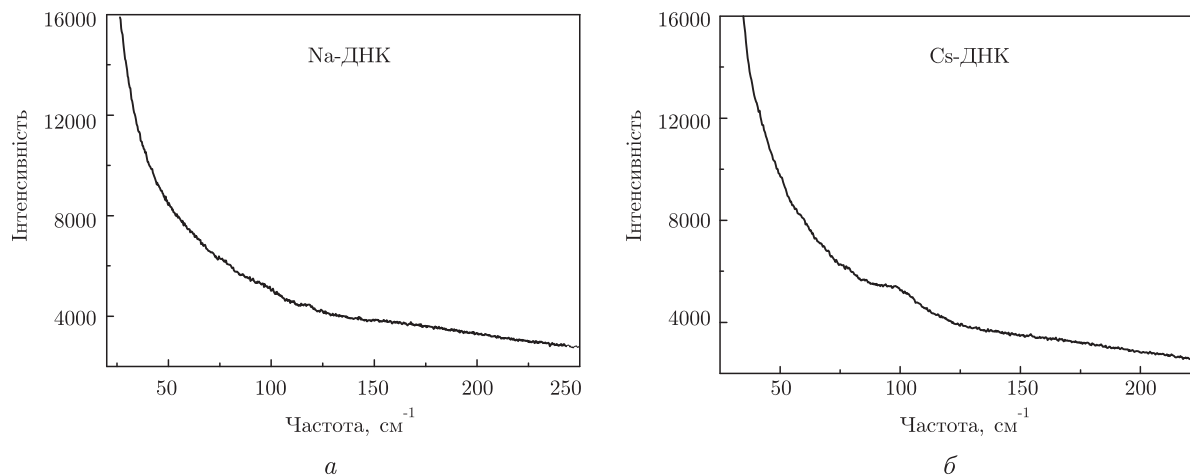


Рис. 1. Низькочастотні спектри молекули ДНК: *a* — Na-ДНК; *б* — Cs-ДНК

Для приготування зразків Na- та Cs-ДНК використовували натрієву сіль ДНК з тимусу теляти з молекулярною масою $\sim 10^7$ а.о.м. Спочатку її розчиняли у дистильованій воді до концентрації 0,2% маси, а далі обробляли ультразвуком з частотою 22 кГц. Методом електрофорезу визначено, що після такої обробки молекулярна маса ДНК зменшилася до $\sim 10^5$ а.о.м. Cs-ДНК ми отримували з Na-ДНК шляхом заміни протиіонів Na^+ на Cs^+ за методикою [7]. Для заміни протиіонів в розчин Na-ДНК з концентрацією 0,2% додавали 0,5 моль CsCl і два об'єми етилового спирту. Зразки зберігали при температурі -20°C протягом трьох діб. У спиртовому розчині ДНК з сіллю CsCl відбувалася заміна протиіонів Na^+ на Cs^+ , яка контролювалася за допомогою спектрів електронних переходів в іонах. Для позбавлення надлишкової солі процедуру повторювали, але при набагато меншій концентрації солі CsCl (0,05 моль). Отриманий осад висушувався при кімнатній температурі протягом трьох діб. Висушена Cs-ДНК розчинялася у воді до концентрації 4%, яка контролювалася по смузі поглинання 256 нм. У висококонцентровані розчини Na- та Cs-ДНК (4%) додавали 0,5 моль відповідної солі (NaCl або CsCl).

Зразки збуджувалися випромінюванням аргонного лазера з довжиною хвилі $\lambda = 5145\text{\AA}$. Реальна потужність випромінювання на зразку становить ($\sim 60 \div 80$) мВт. Промінь лазера потрапляв в кварцову кювету зі зразком так, що трек променя і вхідна щілина монохроматора (ДФС-24) були паралельними. Об'єм кювет становив $\sim 0,06$ мл, висота ~ 15 мм. Досліджувані спектри комбінаційного розсіяння ДНК мали малу інтенсивність, тому для покращення співвідношення сигнал/шум необхідно було збільшувати час експозиції в точці до ($\sim 4 \div 8$) с. В результаті проведеного експерименту отримано спектри комбінаційного розсіяння водних розчинів Na- та Cs-ДНК в діапазоні від 30 до 230 см^{-1} (рис. 1). Як видно з рис. 1, спектри мають характерну для ДНК смугу 100 см^{-1} , інтенсивність якої в Cs-ДНК більша, ніж в Na-ДНК.

Для виділення моди іон-фосфатних коливань ДНК проводилася детальна математична обробка форми одержаних спектрів. Обробка полягала в згладжуванні спектрів кривою Лоренца. Після віднімання від Лоренцевої кривої спектр розкладали на гауссові криві, в результаті чого визначено положення мод з похибкою $\pm 2\text{ см}^{-1}$. Інтенсивності коливальних мод нормувалися на інтенсивність широкої смуги коливань води в області 180 см^{-1} , оскільки в обох спектрах вона має приблизно однакову величину. Нормовані спектри Na- і Cs-ДНК

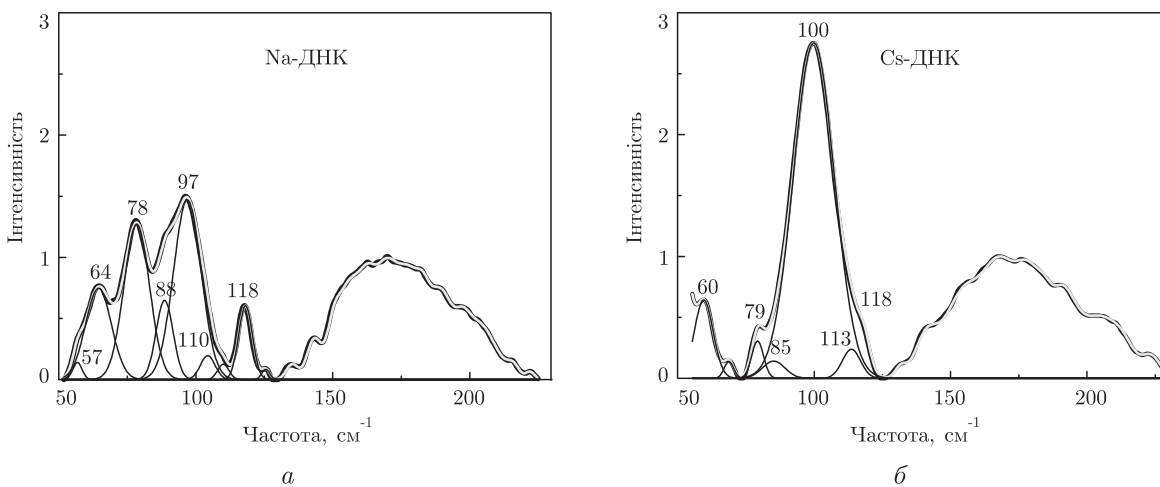


Рис. 2. Низькочастотні спектри молекули ДНК після обробки: *a* — Na-ДНК; *б* — Cs-ДНК

наведено на рис. 2, звідки видно, що в області від 50 до 120 cm^{-1} в спектрі Na-ДНК спостерігаються піки 78 і 118 cm^{-1} , а також смуги 64 та 97 cm^{-1} . В спектрі Cs-ДНК в цій області спостерігаються моди 60, 79 і 118 cm^{-1} , а також інтенсивна смуга 100 cm^{-1} . Смуга 100 cm^{-1} в спектрі Cs-ДНК майже вдвічі інтенсивніша, ніж відповідна смуга в спектрі Na-ДНК, а моди 79 і 118 cm^{-1} — навпаки, набагато слабші. В отриманих спектрах Na-і Cs-ДНК в діапазоні вище 130 cm^{-1} спостерігається широка смуга коливань води біля 180 cm^{-1} [11]. Виділення з цієї смуги коливань ДНК є предметом окремого дослідження, тому в даній роботі моди вище 130 cm^{-1} детально не обговорюються.

Для виявлення моди іон-фосфатних коливань ДНК проведено порівняння отриманих частот коливань з існуючими експериментальними та розрахунковими даними [4–6, 8]. Значення частот коливань, а також характер структурних рухів ДНК на кожній моді наведені в табл. 1. Як видно з таблиці, структура спектра розчину Na-ДНК така ж, як у висушених плівок полінуклеотидів і кристалів ДНК [6, 8]. Спектри Cs-ДНК в даному діапазоні експериментально досліджені недостатньо, проте відомо, що біля 95 cm^{-1} спостерігається мода, частота якої істотно залежить від типу протиіону [5].

Проведене порівняння експерименту з розрахунковими даними [3, 4] показує, що смуга 64 cm^{-1} в спектрі Na-ДНК характеризує коливання, пов'язані зі зміщеннями азотистих основ відносно фосфатних груп остова ДНК (ω_{H+S}). При цьому відбувається деформація цукрового кільця і розтяг водневих зв'язків в парах азотистих основ. Смуга 97 cm^{-1} характеризує коливання азотистих основ, пов'язані з розтягом водневих зв'язків (ω_H). Пік

Таблиця 1. Частоти коливань спектрів Na- та Cs-ДНК (cm^{-1}) (*n* — плече; *c* — смуга)

Na-ДНК	Наш експеримент (рис. 2, <i>a</i>)	57 <i>n</i> ; 64	78	88 <i>n</i> ; 97 <i>c</i> ; 110 <i>n</i>	118	180 <i>c</i>
	Експеримент [6]	63	80	95; 106	—	170
	Експеримент [8]	68	—	96	120	—
	Теорія [3]	$58\omega_{H+S}$	$81\omega_S$	$112\omega_H$	—	$251\omega_{ion}$
	Теорія [4]	—	—	—	—	$173\omega_{ion}$
Cs-ДНК	Наш експеримент (рис. 2, <i>б</i>)	—	60; 69 <i>n</i> ; 79	85 <i>n</i> ; 100 <i>c</i> ; 113 <i>n</i>	118 <i>n</i>	180 <i>c</i>
	Експеримент [5]	—	—	95	—	—
	Теорія [3]	$46\omega_{H+S}$	$63\omega_S$	$99\omega_H$; $108\omega_{ion}$	—	—
	Теорія [4]	—	—	$104\omega_{ion}$	—	—

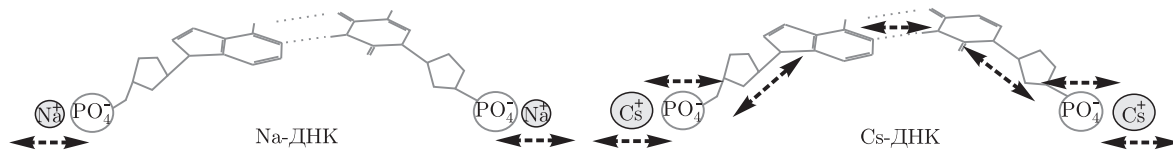


Рис. 3. Характер рухів структурних елементів пари нуклеотидів на моді іон-фосфатних коливань Na- та Cs-ДНК за даними роботи [3]

78 см^{-1} в спектрі Na-ДНК, згідно з розрахунками [3], характеризує коливання азотистих основ відносно фосфатних груп остова ДНК, які пов'язані з деформацією цукрового кільця (ω_S). При цьому водневі зв'язки в парах нуклеотидів не розтягуються. Інтенсивність моди 118 см^{-1} , при заміні протиіонів Na^+ на Cs^+ , змінюється так само, як і 78 см^{-1} , тому можна припустити, що ця мода також пов'язана з деформацією цукру. Мода іон-фосфатних коливань Na-ДНК (ω_{ion}), згідно з розрахунками [4], потрапляє в смугу коливань води біля 180 см^{-1} або заходиться вище [3].

У випадку Cs-ДНК розрахунки [3, 4] показують, що пік 60 см^{-1} характеризує коливання азотистих основ відносно фосфатних груп остова ДНК, пов'язані з деформацією цукрового кільця (ω_S), а смуга біля 100 см^{-1} формується коливаннями розтягу водневих зв'язків в парах азотистих основ (ω_H) та іон-фосфатними коливаннями (ω_{ion}). Мода Cs-ДНК, яка характеризує коливання розтягу водневих зв'язків в парах азотистих основ та деформацію цукрового кільця (ω_{H+S}), згідно з розрахунками [3], повинна знаходитися біля 44 см^{-1} , тобто за межами досліджуваного діапазону. Моди 79 і 118 см^{-1} в спектрі Cs-ДНК мають набагато меншу інтенсивність, ніж в Na-ДНК, і виникають за рахунок залишкових іонів Na^+ в зразку Cs-ДНК.

Таким чином, проведений аналіз показав, що іон-фосфатні коливання Cs-ДНК разом з модами розтягу водневих зв'язків в парах азотистих основ формують смугу 100 см^{-1} . При цьому інтенсивність смуги зростає майже вдвічі порівняно з спектром Na-ДНК (див. рис. 2). Мода іон-фосфатних коливань Na-ДНК знаходиться в більш високочастотній області ($170 \div 250 \text{ см}^{-1}$) і не виділяється серед мод цього діапазону спектра. Щоб визначити, чому моди іон-фосфатних коливань Cs-ДНК проявляються, а Na-ДНК не проявляються, слід розглянути, як співвідносяться між собою інтенсивності мод іон-фосфатних коливань Na- та Cs-ДНК.

Відомо, що інтенсивність коливальної моди, активної в спектрах комбінаційного розсіяння, пропорційна квадрату похідної від поляризованості по нормальній координаті [12]. В роботі [3] показано, що мода іон-фосфатних коливань Na-ДНК характеризується лише коливаннями протиіонів натрію відносно фосфатних груп остова ДНК. Водночас, в Cs-ДНК ця мода характеризується значними зміщеннями практично всіх структурних елементів подвійної спіралі (рис. 3). Зміщення структурних елементів ДНК, у випадку протиіонів Cs^+ , повинні призводити до суттєвих змін поляризованості молекули, тому інтенсивність моди іон-фосфатних коливань в спектрі Cs-ДНК повинна бути значно вищою, ніж в спектрі Na-ДНК. Це пояснює більшу інтенсивність смуги 100 см^{-1} в спектрі Cs-ДНК порівняно з Na-ДНК.

Таким чином, в даній роботі вперше експериментально спостерігалася мода іон-фосфатних коливань в спектрі комбінаційного розсіяння Cs-ДНК. Показано, що ця мода знаходиться в смугі коливань 100 см^{-1} і підсилює її інтенсивність майже вдвічі. Спостереження моди коливань протиіонів відносно фосфатних груп остова подвійної спіралі підтверджує

існування іон-фосфатної ґратки ДНК, що є важливим для розуміння механізмів її біологічного функціонування.

Автори роботи висловлюють подяку зав. відділом молекулярної біології вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України Ф. І. Товкачу за консультації в приготуванні зразків ДНК.

1. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – Москва: Мир, 1987. – 584 с.
2. *Perelytsya S. M., Volkov S. N.* Ion mode in the DNA low-frequency vibration spectra // Ukr. J. Phys. – 2004. – **49**, No 11. – P. 1072–1077.
3. *Перепелиця С. Н., Волков С. Н.* Ион-фосфатные колебания ДНК в В- и А-формах // Біофіз. вісник. – 2005. – **1** (15). – С. 5–10.
4. *Перепелиця С. М., Волков С. Н.* Ион-фосфатні коливання ДНК. Кристалічний підхід // Сучасні проблеми молекулярної фізики. – Київ: ВПЦ КУ, 2007. – С. 265–271.
5. *Weidlich T., Powell J. W., Genzel L., Rupprecht A.* Counterion effects on the Far-IR vibrational spectra of Poly(rI)·Poly(rC) // Biopolymers. – 1990. – **30**. – P. 477–480.
6. *Powell J. W., Edwards G. S., Genzel L. et al.* Investigation of far-infrared vibrational modes in polynucleotides // Phys. Rev. A. – 1987. – **35**. – P. 3929–3939.
7. *Weidlich T., Lindsay S. M., Rui Qi et al.* A Raman study of low frequency interhelical modes in A-, B- and C-DNA // J. Biomolec. Struct. Dyn. – 1990. – **8**. – P. 139–171.
8. *Lamba Om P., Wang H.-J., Thomas G. J.* Low-frequency dynamics of crystals, of B-, A-, Z-DNA and fibers of C-DNA // Biopolymers. – 1989. – **28**. – P. 667–678.
9. *Volkov S. N., Kosevich A. M.* Theory of low-frequency vibrations in DNA macromolecules // J. Biomolec. Struct. Dyn. – 1991. – **8**. – P. 1069–1083.
10. *Волков С. Н., Косевич А. М.* Конформационная зависимость низкочастотных колебаний макромолекулы ДНК // Биополимеры и клетка. – 1991. – **7**. – С. 40–49.
11. *Urabe H., Sugawara Y., Tsukakoshi M. et al.* Raman spectroscopic study on low-frequency collective modes in self-associates of guanosine monophosphates // Biopolymers. – 1987. – **26**. – P. 963–971.
12. *Применение спектров комбинационного рассеяния /* Под ред. А. Андерсона. – Москва: Мир, 1977. – 588 с.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут теоретичної фізики
ім. М. М. Боголюбова НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 03.04.2007