

АБСОРБЦИОННЫЕ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ОДНО- И ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМИ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ

А.П. АНТОНЯН^{1*}, П.О. ВАРДЕВАНЯН¹, М.С. МИКАЕЛЯН¹,
Г.Г. КОЧАРЯН², Г.А. ПОГОСЯН¹, М.А. ПАРСАДАНЯН¹

¹Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

²Институт химической физики им. А.Б. Налбандяна, НАН Армении, Ереван, Армения

*e-mail: apant@ysu.am

(Поступила в редакцию 7 февраля 2024 г.)

Проведено сравнительное исследование комплексообразования бромистого этидия (БЭ) и метиленового синего (МС) с синтетическими оц-полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU). Выявлено, что интенсивность спектров поглощения этих лигандов уменьшается при взаимодействии с одноцепочечными полинуклеотидами и образовавшегося в результате их гибридизации poly(rA)-poly(rU). Интенсивность флуоресценции также уменьшается в случае комплексов МС-полинуклеотид, в случае же БЭ интенсивность флуоресценции увеличивается, по мере возрастания концентраций полинуклеотидов. На основании анализа спектров флуоресценции комплексов БЭ с оц- и гибридного дц-полинуклеотидов построены кривые связывания в координатах Скотчарда (r/C_f и r) и определены значения параметров связывания – величина константы связывания K и значение оснований n (пар оснований при гибридизации) полинуклеотидов, приходящих на одно место связывания.

1. Введение

В настоящее время олиго- и полинуклеотиды заданной структуры широко применяются в молекулярной биофизике и биологии, в области химического синтеза генов, белковой инженерии, бионанотехнологии (для приготовления ДНК-оригам), при диагностике различных генетических отклонений (с применением праймеров, гибридизационных зондов) [1–3]. Одноцепочечные РНК-полимеры гомогенной структуры (poly A, G, C и U) являются хорошими моделями для проверки зависимость от азотистого основания средства выбранных молекул, а также спектроскопических характеристик исследуемого соединения, индуцированного путем связывания с полимерами [4–7]. Среди спектроскопических методов достаточно информативными являются абсорбционная, флуоресцентная спектроскопии. Последняя, являясь высокочувствительной, получила применение в различных гетерогенных средах, включая живые клетки и ткани [8].

В качестве усилителя флуоресценции в исследованиях НК применяются различные органические красители, среди которых наиболее распространенными являются интеркалирующие соединения, в числе которых – фенантридиновое соединение бромистый этидий (БЭ), тиазиновое соединение метиленовый синий

(МС) и др. [9–11]. В настоящее время хорошо исследованы многие аспекты взаимодействия БЭ с дц-ДНК и РНК [12, 13]. Более того, БЭ является незаменимым в изучении процессов гибридизации полинуклеотидных цепей, а также для создания стабильных двух-, трех- или-мультицепочечных структур (например, для ДНК или РНК наноструктур), поскольку имеет высокую константу ассоциации при интеркаляции в эти структуры [14–16]. В этом контексте особенности взаимодействия БЭ с одноцепочечными полирибонуклеотидами мало изучены, и такие исследования, с одной стороны могут стать хорошим дополнением к имеющимся данным, с другой стороны служить базисом для сравнительных исследований по взаимодействию биологически активных соединений с НК.

В работе [17] нами исследовалось взаимодействие другого интеркалятора, МС с одноцепочечными (оц-) poly(rA) и poly(rU) и гибридной двухцепочечной (дц-) poly(rA)-poly(rU). Для выяснения механизмов связывания этого лиганда с указанными полинуклеотидами необходимы сравнительные исследования, в которых эталоном служат лиганды с известными свойствами связывания с макромолекулами. Именно таковым является БЭ.

Учитывая вышеприведенное, целью данной работы явилось исследование особенностей связывания БЭ с оц-poly(rA), оц-poly(rU) и с образовавшейся в результате их гибридизации двухцепочечной poly(rA)-poly(rU) при ионных силах раствора 0.04 и 0.1 М, оценка сродства БЭ с указанными полинуклеотидами по значениям констант связывания K и числа оснований n , приходящих на одно место связывания, и сравнение полученных данных с результатами исследований по взаимодействию МС с указанными полинуклеотидами.

2. Материалы и методы исследования

В работе были использованы сверхчистые синтетические полинуклеотиды poly(rA) (P9403), poly(rU) (P9528), БЭ, МС (Sigma (США)), бидистиллированная вода, NaCl, Na-цитрат, Na₂EDTA (содержание в рабочих растворах составляло 10⁻⁵ М). Концентрации препаратов определялись спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{480} = 5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для БЭ [10], $\epsilon_{257} = 10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rA), $\epsilon_{260} = 9500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rU) [18]. Средняя молекулярная масса одноцепочечных (оц-) полинуклеотидов составляла 800–1000 кДа. Эксперименты проводились при ионных силах раствора 0.04 и 0.1 М, рН ≈ 7.0 .

Спектрофотометрические измерения образцов проводились на UV-VIS Perkin Elmer Lambda 365 спектрофотометре (USA), в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см, при температуре 22–25°C. Флуоресцентные исследования проводились на Perkin Elmer спектрофлуориметре MPF-44B (USA). При спектрофотометрическом и флуоресцентном титровании концентрация БЭ в растворе оставалась постоянной, концентрации макромолекул увеличивались в интервале изменения $0 \leq r \leq 20$ ($r = P/D$, где P – концентрация фосфатных групп полинуклеотидов, D – концентрация лиганда). Изменения поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ нм}$ и флуоресценции при $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ нм}$, при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ нм}$ регистрировались при каждом соотношении $r = P/D$, вплоть до таких значений, при которых изменения спектров поглощения или флуоресценции становились незначительными. На основании значений флуоресценции комплексов

БЭ с оц- и дц-полинуклеотидами рассчитывались значения r/C_f и r (координаты Скэтчарда). Значения r/C_f и r были определены с помощью уравнений (1)–(3):

$$C_f = \frac{F_{\max} - F}{F_{\max} - F_0} C_0, \quad (1)$$

где F_{\max} – максимальное значение флуоресценции комплекса, F_0 – флуоресценция БЭ в отсутствие полинуклеотидов, F – флуоресценция комплекса при данной концентрации полинуклеотида, C_0 – полная концентрация лиганда в растворе:

$$C_0 = C_f + C_b. \quad (2)$$

Здесь C_f и C_b – концентрации свободных и связанных молекул лиганда в растворе. С помощью C_b можно определить долю молекул лиганда, находящихся в комплексе с полинуклеотидами:

$$r = C_b / C_p, \quad (3)$$

где C_p – концентрация фосфатных групп полинуклеотидов в растворе.

С помощью зависимости r/C_f от r построены кривые Скэтчарда по формуле

$$r / C_f = K(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1}, \quad (4)$$

которая линейризовалась по формуле [19]

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - (2n - 1)r), \quad (5)$$

где r – число оснований, находящихся в комплексе с молекулами лиганда, K – константа связывания, n – число оснований, приходящихся на одно место связывания.

Спектры поглощения комплексов были анализированы и построены с помощью программы Microsoft Excel 2016. Кривые связывания в координатах Скэтчарда – Wolfram Mathematica 13. Значения K и n определялись с помощью формул (4), (5), с помощью программы Wolfram Mathematica 13. Экспериментальная погрешность при регистрации поглощений и флуоресценции не превышала 5%.

3. Результаты и обсуждение

Среди гомополинуклеотидных последовательностей полирибоадениловая кислота – poly(rA), представляет наибольший интерес, поскольку имеет важное значение в функционировании мРНК. Все эукариотические мРНК имеют длинные poly(rA) хвосты на 3'-конце, которые играют ключевую роль в ее созревании и стабилизации, а также в инициировании трансляции. С этой точки зрения, эти последовательности могут стать специфической мишенью при терапии злокачественных новообразований [20]. В этом направлении одним из эффективных подходов может стать блокировка poly(rA)-хвоста мРНК комплементарной poly(rU) нитью, в результате их гибридизации. С этой целью нами проводилось исследование комплексообразования классического интеркалятора БЭ с оц- poly(rA) и poly(rU) и гибридной дц-poly(rA)-poly(rU).

На рис.1 приведены спектры поглощения БЭ (1) и его комплексов с оц-poly(rA) (2-15) при ионной силе раствора 0.04 М (а). В правом верхнем углу приведена также кривая зависимости соотношения A/A_0 от концентрации оц-poly(rA), отражающей изменение степени гипохромности при связывании

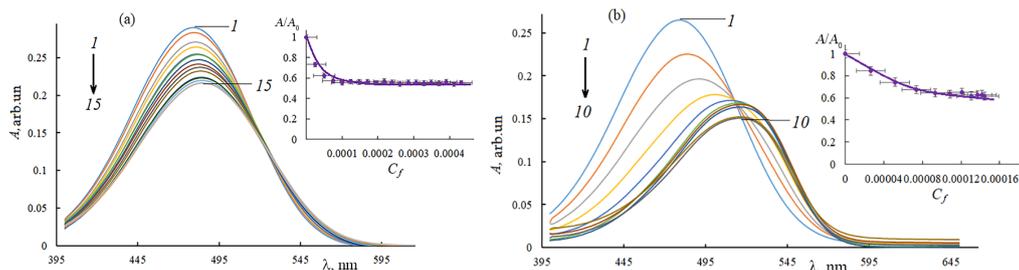


Рис.1. Спектры поглощения БЭ (I) и его комплексов с (а) oc - $poly(rA)$ кривые (2–15) при ионной силе раствора 0.04 М и с (b) $poly(rA)$ - $poly(rU)$ кривые (2–10) при ионной силе раствора 0.1 М. На вставках приведены кривые зависимости A/A_0 от концентрации полинуклеотида – C_p .

лиганда с полинуклеотидом. Из приведенного рисунка видно, что спектры поглощения комплексов уменьшены в максимумах и сдвинуты в длинноволновую область примерно на 5 нм, как и в случае МС- oc -полинуклеотид комплексов [17]. Этот эффект является результатом сильного межмолекулярного взаимодействия, вследствие эффективного перекрытия π -электронного облака лиганда основаниями РНК, и указывает на интеркаляционный механизм связывания. Указанные изменения имеют место при уменьшении локальной полярности в непосредственном окружении лиганда, молекулы которого переходят в пространство между основаниями одноцепочечных полинуклеотидов, что и приводит к батохромному сдвигу в длинноволновую область [18].

Исследования проводились также при ионной силе раствора 0.1 М (спектры поглощения и кривые зависимости A/A_0 от концентрации полинуклеотида схожи, поэтому не приводятся). Полученные данные указывают на то, что взаимодействие БЭ с oc - $poly(rA)$ зависит от ионной силы раствора и предпочтительно имеет место при ионной силе раствора 0.04 М. Аналогичный эффект получен при взаимодействии БЭ с oc - $poly(rU)$ (спектры не приведены). В случае же МС эффект уменьшения спектров поглощения намного меньше при комплексообразовании с oc - $poly(rU)$ и значительный в случае oc - $poly(rA)$ [17]. Этот факт указывает на то, что oc - $poly(rA)$ и oc - $poly(rU)$ для БЭ являются одинаковой мишенью, в то время как для МС более предпочтительной мишенью является полиадениловая кислота. Мы полагаем, что предпочтительность МС к oc - $poly(rA)$ обусловлена структурными особенностями этого полинуклеотида, который в растворе находится в виде упорядоченной спирали, с высокой степенью стэкинг-взаимодействий между соседними основаниями при физиологическом рН [18, 19].

Степень гипохромности и батохромный эффект более выражены при взаимодействии БЭ с гибридованным в отсутствие лиганда $poly(rA)$ - $poly(rU)$, как это видно из рис.1b. Аналогичные результаты получены при титровании растворов комплексов БЭ- oc - $poly(rA)$ раствором oc - $poly(rU)$, до установления эквимлярных концентраций одноцепочечных полинуклеотидов (тождественные результаты получены при обратном титровании комплексов БЭ- oc - $poly(rU)$ раствором oc - $poly(rA)$). Очевидно, что в результате добавления комплементарной нити на раствор комплексов БЭ- oc -полирибонуклеотид (oc - $poly(rA)$ на oc - $poly(rU)$ или наоборот), имеет место гибридизация и образование $poly(rA)$ - $poly(rU)$, вследствие чего спектры поглощения комплексов лиганда с этими

структурами, а также зависимости A/A_0 от концентрации полинуклеотида практически одинаковые. Схожий эффект нами был получен ранее, при исследовании взаимодействия БЭ с двухцепочечной poly(rA)-poly(rU) [20]. Иной результат получен при взаимодействии МС с этими полинуклеотидами. При титрации раствора комплексов МС с оц-poly(rA) раствором оц- poly(rU) (и наоборот), имеет место уменьшение спектров, однако, при определенных соотношениях образовавшихся гибридных дц-структур наблюдается возрастание спектров поглощения [17].

Из рис.1а, б видно, что кривые зависимости A/A_0 комплексов в случае БЭ резко уменьшаются при низких концентрациях полинуклеотида и выходят на плато как в случае poly(rA), так и в случае poly(rA)-poly(rU). При ионной силе раствора 0.1 М зависимость A/A_0 претерпевает небольшое монотонное уменьшение в случае связывания БЭ с оц-poly(rA). На основании этого мы полагаем, что оц-poly(rA), в указанных ионных силах раствора находится в различных структурных состояниях, и для связывания БЭ более предпочтительной является структура этого полинуклеотида, установленная при ионной силе 0.04 М. Аналогичный эффект получен в работе [20], в которой показано, что наиболее предпочтительную структуру, для связывания БЭ, poly(rA)-poly(rU) принимает при ионной силе раствора 0.04 М.

Получены также спектры флуоресценции комплексов БЭ с указанными полинуклеотидами. Отметим, что спектр испускания этого флуоресцентного красителя лежит в области 520–750 нм, с максимумом 610 нм, при длине волны возбуждения 510 нм [19]. По мере увеличения концентрации полинуклеотидов, при постоянной концентрации лиганда, имеет место возрастание интенсивности флуоресценции, которое достигает насыщения и небольшого сдвига в коротковолновую область, при соотношениях $r \sim 20$.

На рис.2 приведены спектры флуоресценции комплексов БЭ-оц-poly(rA) (а) и с оц-poly(rU) (б) при ионной силе раствора 0.04 М и кривые зависимости F/F_0 от C_p , количественно отражающие относительное увеличение интенсивности флуоресценции. Из полученных спектров видно, что имеет место возрастание интенсивности при связывании БЭ с оц-poly(rA) (кривые 2–10, на рис.2а) и с оц-poly(rU) (кривые 2–16, на рис.2б) по сравнению с интенсивностью БЭ, в отсутствие полинуклеотида (схожее изменение наблюдалось при взаимодействии БЭ с оц-poly(rA) при ионной силе раствора 0.1 М, кривые не приводятся). Известно, что интенсивность флуоресценции БЭ резко возрастает при взаимодействии с двухцепочечной ДНК, что является следствием полной интеркаляции молекул лиганда [11]. С этой точки зрения мы полагаем, что связанные с оц-полинуклеотидами молекулы лиганда становятся менее доступными для тушителей. Это возможно в том случае, если флуорофорные группы БЭ находятся в менее полярной среде, что имеет место за счет полуинтеркаляционного способа связывания этого лиганда с одноцепочечными полинуклеотидами. С другой стороны, полную интеркаляцию фактически можно исключить в силу того, что увеличение интенсивности флуоресценции связанных молекул БЭ существенно меньше, чем при полной интеркаляции.

Из рис.2 также видно, что имеет место монотонное увеличение интенсивности флуоресценции комплексов БЭ-оц-полинуклеотид, при ионной силе раствора 0.04 М. Однако, по сравнению с полученными данными для комплексов БЭ-оц-

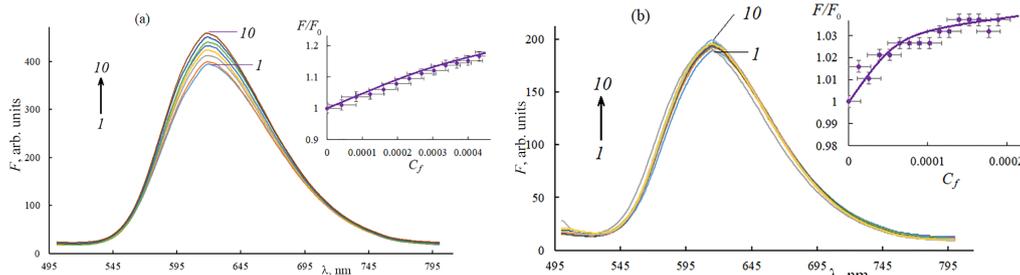


Рис.2. Спектры флуоресценции комплексов БЭ с (а) poly(rA) и с (b) poly(rU), при ионной силе раствора 0.04 М. На вставках приведены кривые зависимости F/F_0 от концентрации полинуклеотида – C_p .

poly(rA), увеличение интенсивности комплексов в случае оц-poly(rU) – (F/F_0 от C_p) примерно в 3 раза меньше. Более того флуоресцентные свойства комплексов БЭ-оц-poly(rU) практически не проявляют зависимость от ионной силы раствора, в противоположность комплексам БЭ-оц-poly(rA).

Существенно иная картина обнаруживается при титрации раствора БЭ раствором, содержащим оц-poly(rA) и оц-poly(rU) в эквимольных концентрациях. В этом случае интенсивность флуоресценции резко возрастает, как это имеет место при связывании БЭ с дц-ДНК или дц-РНК [20]. При смешивании в эквимольных концентрациях, оц-poly(rA) и оц-poly(rU) гибридизируются и образуется двухцепочечная poly(rA)-poly(rU) в растворе, в результате которого основным способом связывания БЭ становится полная интеркаляция, поскольку флуоресцентные характеристики становятся тождественными с таковыми, соответствующими полной интеркаляции. Этот факт находится в полном соответствии с результатами работы [20], при взаимодействии БЭ с двухцепочечной poly(rA)-poly(rU). При гибридизации оц-poly(rA) с оц-poly(rU) и образовании дц-poly(rA)-poly(rU), интенсивность флуоресценции комплексов БЭ с ним возрастает примерно в 6–8 раз, как это видно из рис.3. Этот эффект также обусловлен зависимостью от ионной силы раствора.

В случае же МС выявлено, что интенсивность флуоресценции при взаимодействии с оц-poly(rU) возрастает, а при взаимодействии с оц-poly(rA) уменьшается, как и при взаимодействии с дц-НК. Тушение интенсивности флуоресценции МС при комплексообразовании с оц- или дц-НК обусловлено полуинтеркационным способом связывания [17, 20]. Мы полагаем, что БЭ и МС с оц-полинуклеотидами связываются посредством частичной интеркаляции (полуинтеркаля-

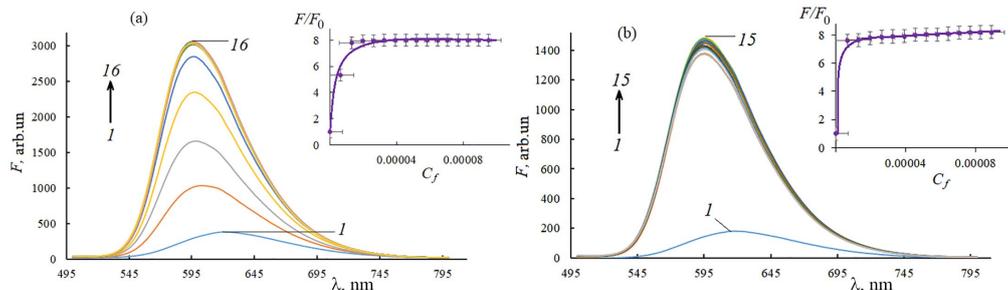


Рис.3. Спектры флуоресценции БЭ (I) и его комплексов с poly(rA)-poly(rU) при ионных силах раствора (а) 0.04 и (b) 0.1 М. На вставках приведены кривые зависимости F/F_0 от концентрации полинуклеотида – C_p .

ция), локализуясь в пространство между соседними основаниями вдоль цепи. С дц-полинуклеотидами (дц-НК) БЭ связывается посредством полной интеркаляции, экранируясь от молекул тушителей (вода, молекулы растворенного кислорода и ионов), в то время как МС и с дц-рибополинуклеотидами (как и дц-НК) взаимодействует полуинтеркаляционным способом [20–23].

На основании анализа изменений спектров флуоресценции комплексов рассчитаны значения r/C_f и r по формулам (1)–(3), и построены кривые связывания БЭ с указанными полинуклеотидами. На рис.4а–f приведены кривые, полученные при ионных силах 0.04 и 0.1 М. Приведенные кривые практически прямолинейные и описывают связывание одним способом. Отметим, что кривые, построенные по формулам (4) и (5), дают практически одинаковые результаты, что также подтверждает тот факт, что на основании спектров флуоресценции комплексов выявляется только один способ связывания [21]. Как видно из полученных изотерм адсорбции, взаимодействие БЭ с указанными полинуклеотидами некооперативное, и на их основании рассчитаны значения параметров связывания – константы связывания K и числа оснований n (в случае poly(rA)–poly(rU) – пар оснований), приходящихся на одно место связывания, которые обобщены в табл.1. Из табличных данных видно, что величины значений параметров связывания проявляют зависимость от ионной силы раствора. Тем не менее, значения констант связывания БЭ с оц-poly(rA), полученные при 0.04 и 0.1 М мало

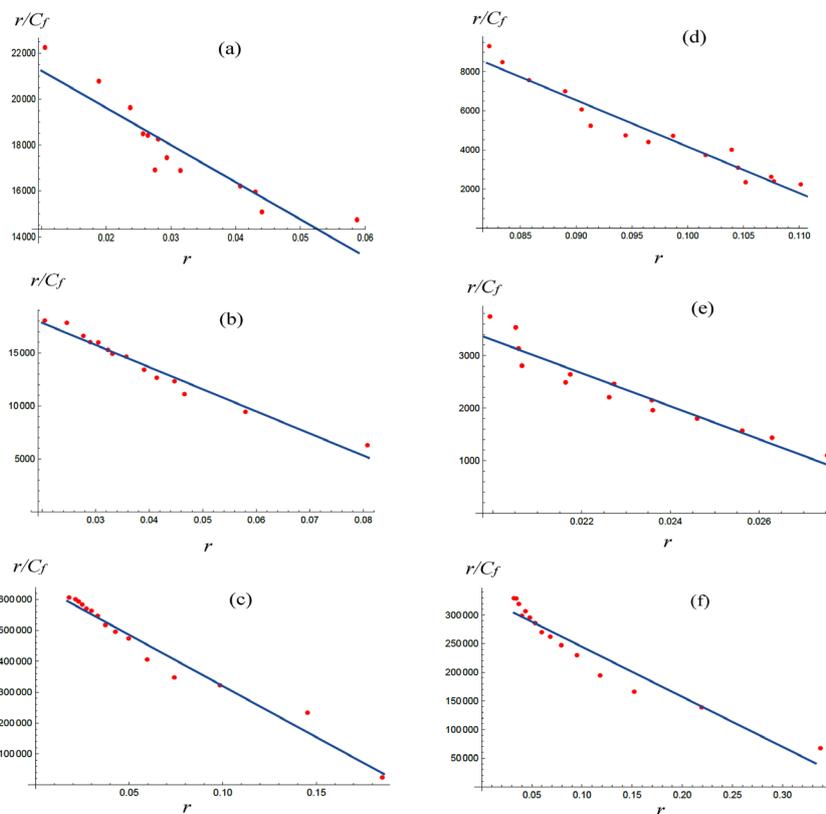


Рис.4. Кривые связывания БЭ с оц-poly(rA) (а), оц-poly(rU) (b) и poly(rA)-poly(rU) (c), полученные при ионной силе раствора 0.04 М и (d), (e) и (f) при ионной силе раствора 0.1 М, соответственно.

Табл.1. Значения параметров связывания БЭ с оц-poly(rA), оц-poly(rU) и poly(rA)-poly(rU) I – ионная сила раствора, K – константа связывания, n –число оснований, приходящих на одно место связывания. K и n определялись по формулам (4) и (5)

Полинуклеотид	0.04 М		0.1 М	
	$K \times 10^{-5}, M^{-1}$	n	$K \times 10^{-5}, M^{-1}$	n
оц-poly(rA)	0.28 ± 0.05	8.0 ± 1.0	0.23 ± 0.05	10 ± 1.0
оц-poly(rU)	0.22 ± 0.05	4.0 ± 1.0	0.095 ± 0.005	10 ± 1.0
poly(rA)-poly(rU)	6.50 ± 0.5	6.0 ± 1.0	3.30 ± 0.5	4.0 ± 1.0

отличаются. В то же время, значение n меньше при 0.04 М. Это указывает на то, что при ионной силе раствора 0.04 М структура оц-poly(rA) более доступна для молекул лиганда, чем при 0.1 М. В то же время, сродство БЭ к этому полинуклеотиду практически одинаковое при обоих ионных силах раствора. Полученные данные указывают на то, что под влиянием ионной силы ограничивается в основном число центров адсорбции для молекул лиганда этим способом.

В случае оц-poly(rU) наблюдается существенная зависимость от ионной силы раствора, поскольку значения K отличаются примерно в 2 раза, а значения n – в 2.5 раза. Мы полагаем, что структура оц-poly(rU) при ионной силе 0.1 М менее доступна для связывания БЭ. По всей вероятности, оц-poly(rU), которая менее упорядоченная, чем оц-poly(rA) [18], при высоких ионных силах принимает такую структуру, на которой места для связывания БЭ становятся более ограниченными. В случае poly(rA)-poly(rU) также обнаруживается зависимость сродства лиганда к этому полинуклеотиду от ионной силы раствора, поскольку при 0.1 М значение K вдвое меньше, чем при 0.04 М. Неожиданным, с этой точки зрения является то, что значение n меньше, чем при ионной силе раствора 0.04 М. Тем не менее, полученные результаты находятся в соответствии с результатами работы [20].

4. Заключение

Результаты экспериментальных исследований указывают на то, что фенантридиновое соединение БЭ, как и тиазиновый краситель МС, являющиеся дц-ДНК специфическими лигандами, связываются и с одноцепочечными полинуклеотидами. На основании полученных данных можно также констатировать, что БЭ и МС стимулируют процесс гибридизации и образование дц-poly(rA)-poly(rU) в стандартных условиях (при комнатной температуре, нейтральных значениях pH) [19, 20].

Полученные данные могут иметь практическое значение для понимания молекулярных механизмов взаимодействия интеркалирующих соединений с различными структурами нуклеиновых кислот, а также для дизайна терапевтических веществ на их основе. С другой стороны, эти данные могут стать основой для разработки новых подходов для модуляции генной экспрессии на основании ингибирования гомополинуклеотидных участков мРНК посредством комплементарных нитей.

ЛИТЕРАТУРА

1. V. Metelev, T. Oretskaya. Russian J. Bioorganic Chemistry, **47**, 339 (2021).
2. D.A. Glazier, J. Liao, B.L. Roberts, X. Li, K. Yang, C.M. Stevens, W. Tang.

- Bioconjugate Chemistry, **31**, 1213 (2020).
3. **C.F. Bennett**. Annual Review of Medicine, **70**, 307 (2019).
 4. **C.P. Wigington, K.R. Williams, M.P. Meers, G.J. Bassell, A.H. Corbett**. Wiley Interdiscip Rev RNA, **5**, 601 (2014).
 5. **N.N. Zhigalova, V.N. Zozulya, O.A. Ryazanova**. Biological Physics, Biomolecules, (2020).
 6. **B. Pradhan, L. Haque, S.R.S. Das**. PLOS ONE, **9**, e8799 (2014).
 7. **J.M.I. Vo, L. Mulrone, J. Quick-Cleveland, M. Jain, M. Akeson, M. Ares jr.** RNA, **27**, 1497 (2021).
 8. **R.W. Sinkeldam, Y. Tor**. Naturally Occurring and Synthetic Fluorescent Biomolecular Building Blocks, in Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design and Applications. L.M. Wilhelmsson, Y. Tor (Eds.). NJ, JohnWiley & Sons Inc, Hoboken 2016.
 9. **I. Piantanida, B.S. Palm, M. Z'anic', H.s-J. Schneider**. J. Chem. Soc. Perkin Transaction, **2**, 1808 (2001).
 10. **R. Galindo-Murillo, Th.E. Cheatham**. Nucleic Acids Research, **49**, 3735 (2021).
 11. **D. Zhang, D. Kondhare, P. Leonard, F. Seela**. Chem. Eur. J., **28**, e202201294 (2022).
 12. **A.C. H.Castro, E.G. França, L.F. de Paula, M.M.C.N. Soares, L.R. Goulart, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro**. Applied Surface Science, **314**, 273 (2014).
 13. **M.L. D'Amico, V. Paiotta, F. Secco, M. Venturini**. J. Phys. Chem. B, **106**, 12635 (2002).
 14. **N.C. Seeman**. Annual Review of Biochemistry, **79**, 65 (2010).
 15. **P. Guo**. Nature Nanotechnology, **5**, 833 (2010).
 16. **F.C. Simmel, B. Yurke, H.R. Singh**. Chemical Reviews, **119**, 6326 (2019).
 17. **P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, Z.H. Movsisyan, M.A. Parsadanyan, M.A. Shahinyan, K.R. Grigoryan, H.A. Shilajyan**. J. Biomol. Struct and Dyn., **41**, 15320 (2023).
 18. **N.W. Luedtke, J.S. Hwang, E. Nava, D. Gut, M. Kol, Y. Tor**. Nucleic Acids Research, **31**, 5732 (2003).
 19. **S. Das, S. Parveen, A.B. Pradhan**. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **118**, 356 (2014).
 20. **M. Hossain, A. Kabir, G.S. Kumar**. Dyes and Pigments, **92**, 1376 (2012).
 21. **P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, M.A. Shahinyan**. J. Biomolecular Structure and Dynamics, **38**, 2493 (2020).
 22. **J.R. Lakowicz**. Principles of Fluorescent Spectroscopy. Springer, New York, (2006).
 23. **P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, H.G. Davtyan, A.T. Karapetyan**. Experimental and Molecular Medicine, **35**, 527 (2003).

ABSORPTION AND FLUORESCENCE CHARACTERISTICS OF THE BINDING OF ETHIDIUM BROMIDE WITH SYNTHETIC SINGLE- AND DOUBLE-STRANDED POLYRIBONUCLEOTIDES

A.P. ANTONYAN, P.O. VARDEVANYAN, M.S. MIKAELIAN,
G.H. KOCHARYAN, G.H. POGHOSYAN, M.A. PARSADANYAN

A comparative study of the complex formation of ethidium bromide (EtBr) and methylene blue (MB) with synthetic single-stranded (ss-) polynucleotides poly(rA) and poly(rU) was conducted. The absorption spectra of these ligands were found to decrease upon interaction with ss-polynucleotides as well as poly(rA)-poly(rU) formed at their hybridization. In the case of the complexes MB-polynucleotide, the fluorescence intensity decreases, while in the case of EtBr, the fluorescence intensity increases along with the enhancement of concentrations of polynucleotides. Based on the fluorescence spectra analysis of the complexes EtBr with ss- and hybrid ds-polynucleotides, the binding curves in Scatchard's coordinates were constructed (r/C_f on r), and the values of the binding parameters of polynucleotides were determined, including the binding constant value K and the number of bases n (base pairs at hybridization) per binding site.