

БИОФИЗИКА

УДК 577.113.6

П.О. Варdevанян¹, А.П. Антонян¹, К.В. Пирумян¹, Л.А. Тавадян²

Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК спектральным и электрохимическим методами

(Представлено чл.-кор. НАН РА А.А. Трчуняном 6/XI 2007)

Ключевые слова: *ДНК, бромистый этидий, дифференциальная спектроскопия, дифференциальная импульсная вольтамперметрия, преобразования Скотчарда*

Связывание бромистого этидия (БЭ) с ДНК изучается различными спектроскопическими методами, которые позволяют обнаружить не только структурные особенности комплексов, но и определить термодинамические параметры связывания [1-5]. В последнее время многими авторами для исследования взаимодействия малых молекул – лигандов с ДНК используются также электрохимические методы (циклическая вольтамперметрия (ЦВ), дифференциальная импульсная вольтамперметрия (ДИВ) и др.) [6-10]. С этой точки зрения хорошим дополнением в подобных исследованиях может явиться дифференциальная спектроскопия (ДС) (в ультрафиолетовом и видимом диапазоне электромагнитных волн), позволяющая регистрировать малые изменения в физических и физико-химических характеристиках образца.

Целью данной работы явились сравнительные исследования взаимодействия БЭ с ДНК методами ДС и ДИВ исходя из того, что спектральные и электрохимические характеристики связанных и несвязанных молекул БЭ с ДНК существенно должны отличаться и эти методы могут быть информативными как при изучении взаимодействия лигандов с макромолекулами, так и при определении значений констант связывания K' и числа пар оснований n , приходящихся на одно место связывания. Более того, подобные исследования могут внести однозначность в оценку полученных результатов.

В работе были использованы сверхчистая ДНК тимуса телят, любезно предоставленная Д.Ю. Ландо, БЭ ("Sigma", США) и химически чистые NaCl, Na-цитрат, ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), NaOH, метанол, ацетон (ultrapure, "Fluka"). Все препараты были использованы без дополнительной очистки. Растворы препаратов были приготовлены при ионной силе 0.02 M Na⁺.

Концентрации ДНК и БЭ определялись спектрофотометрически, с использованием коэффициентов молярного поглощения $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК и $\epsilon_{480} = 5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для БЭ соответственно.

Спектрофотометрические измерения проводились на двулучевом спектрофотометре UV-VIS UNICAM-SP8-100 (Англия). Измерения растворов осуществлялись в герметически закрытых кварцевых кюветах, длиной оптического пути 1 см, с одинаковыми оптическими параметрами. Средняя чувствительность прибора в рабочем диапазоне спектра, измеренная без образцов, равна $5 \cdot 10^{-5}$ единиц оптической плотности, что соответствует изменению точности пропускания $-\Delta I/I = 10^{-4}$ и в конечном итоге дает общую погрешность, не превышающую 3%.

Спектрофотометрическое титрование растворов осуществлялось микрошприцем, с общим объемом 10 мкл ("Hamilton", США).

При регистрации поглощений комплексов БЭ-ДНК концентрация лиганда оставалась постоянной, а концентрационное соотношение r_b изменялось в интервале $-0 \leq r_b \leq 0.5$, где $r_b = \text{БЭ}/\text{ДНК}$ (рассчитанное на пару оснований ДНК). Спектры поглощения раствора комплексов зарегистрированы против раствора чистого БЭ в интервале изменения длины волны $\lambda = 400 - 600 \text{ нм}$. При этом концентрации БЭ в контрольном и исследуемом растворах были одинаковы.

Вольтамперметрические измерения проводились с помощью электрохимического анализатора BAS-100BW (США), как описано в [10].

Графики функций, корреляционные уравнения, коэффициенты корреляции получены с помощью программы Excel (Microsoft). Экспериментальные кривые связывания анализировались методом регрессионного анализа теоретических кривых, полученных с помощью уравнения Крозерса (см. [11]):

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

и того же уравнения, преобразованного Аракеляном и соавторами для случая двух способов взаимодействия лиганда с ДНК [11]:

$$r/C_f = K[1 - (2n-1)r], \quad (2)$$

где r — число мест на ДНК, заполненных молекулами лиганда, C_f — концентрация свободных молекул лиганда. Значения K и n определены из изотерм адсорбции согласно уравнению (2).

Исследования взаимодействия БЭ с ДНК спектроскопическими (абсорбционным, флуориметрическим) методами выявили, что этот лиганд с двухцепочечной (дц) ДНК связывается различными способами — интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим [4]. Однако необходимо отметить, что полуинтеркаляционный комплекс не всегда удастся обнаружить прямым измерением, поскольку этот способ связывания маскируется другими (интеркаляционным, электростатическим) способами. В частности, нами обнаружено, что БЭ с дц-ДНК, кроме флуоресцирующего сильного (интеркаляционного), образует также нефлуоресцирующий сильный комплекс, который выявляется при сравнении флуориметрических и абсорбционных данных [4]. Для выявления этого комплекса непосредственно из эксперимента необходимы чувствительные методы, каковыми являются дифференциальные методы исследований. Для определения термодинамических параметров связывания взаимодействие БЭ с ДНК исследовалось нами методами ДИВ и ДС.

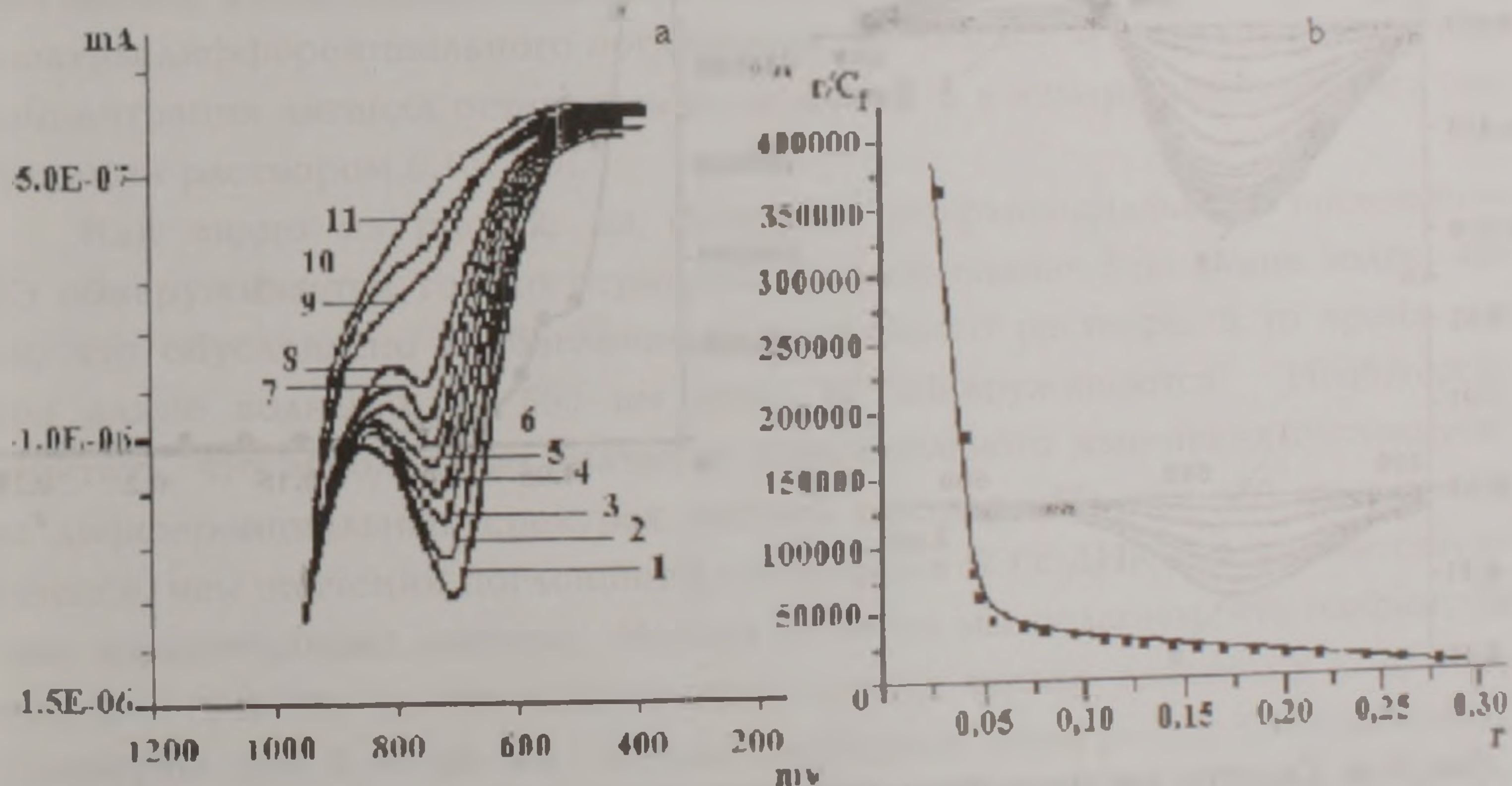


Рис. 1. а. Дифференциальная импульсная вольтамперограмма $1.162 \cdot 10^{-5}$ М БЭ в отсутствие (1) и присутствии (2) $8.17 \cdot 10^{-6}$ М; (3) $1.218 \cdot 10^{-5}$ М; (4) $1.612 \cdot 10^{-5}$ М; (5) $2.001 \cdot 10^{-5}$ М; (6) $2.390 \cdot 10^{-5}$ М; (7) $2.775 \cdot 10^{-5}$ М; (8) $3.526 \cdot 10^{-5}$ М; (9) $6.022 \cdot 10^{-5}$ М; (10) $9.874 \cdot 10^{-5}$ М; (11) $1.531 \cdot 10^{-4}$ М ДНК. Скорость сканирования — 20 мВ с^{-1} .
 б. Кривая связывания БЭ с ДНК в координатах Скетчарда, полученная из анализа вольтамперограмм.

Дифференциальные импульсные вольтамперограммы БЭ и его комплексов с ДНК приведены на рис 1. Как видно из рисунка, вольтамперметрические характеристики свободных и связанных с ДНК молекул БЭ качественно отличаются. По мере увеличения концентрации ДНК в растворе отрицательные пики вольтамперограмм молекул БЭ уменьшаются и начиная со значений соотношений БЭ/ДНК = 1/5 пики практически исчезают. Это указывает на то, что электрохимические характеристики связанных с ДНК молекул БЭ существенно отличаются от таковых свободных молекул лиганда. Исходя из этого методом ДИВ можно не только обнаружить взаимодействие БЭ с ДНК, но и проводить количественный анализ и определить параметры связывания – K и n [10]. Результаты исследований методом ДИВ выявили, что молекулы БЭ с ДНК взаимодействуют, по крайней мере, двумя независимыми способами – сильным и слабым. Из анализа полученных данных определены значения K и n , которые представлены в табл. 1.

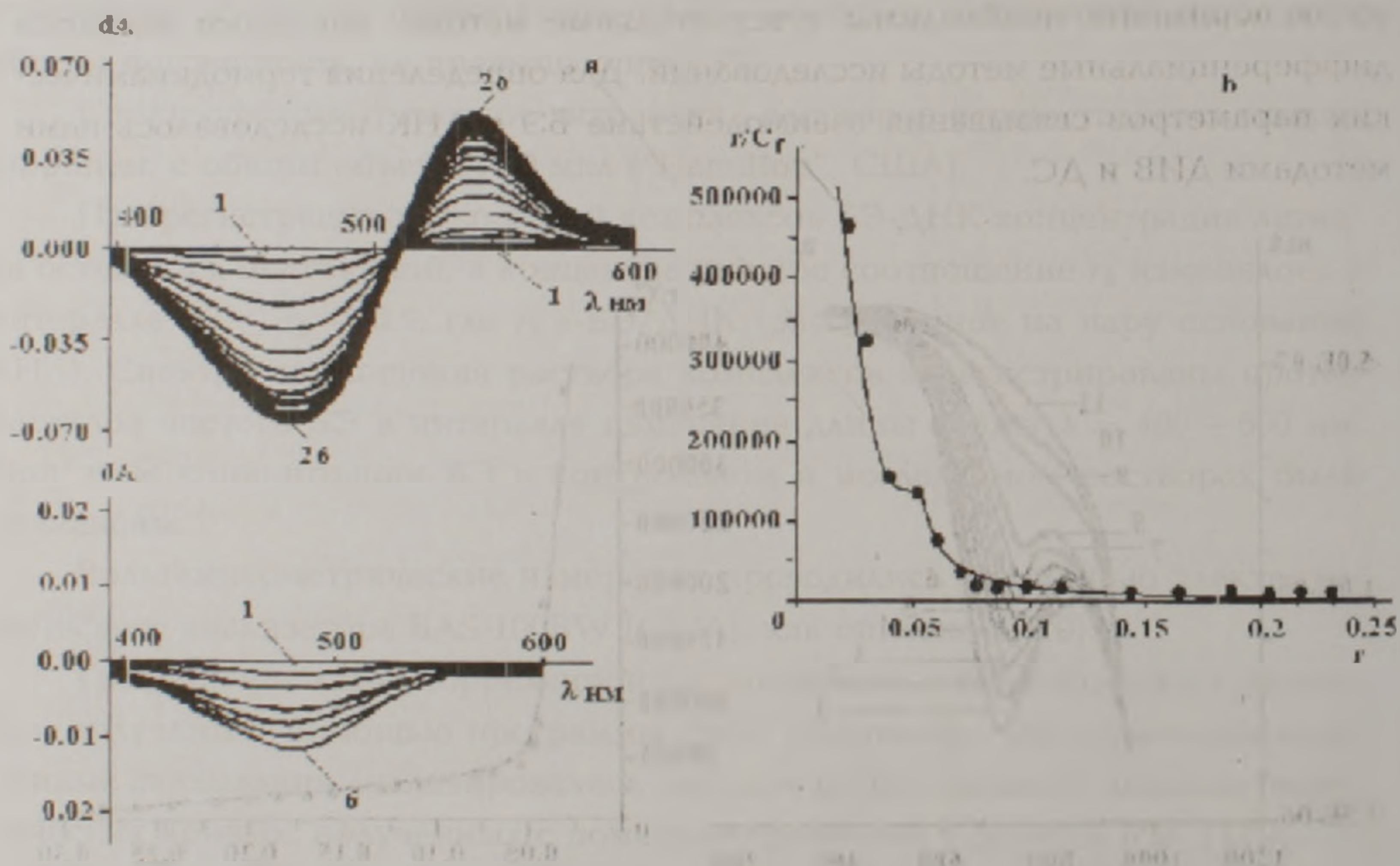


Рис. 2. а. Спектры дифференциального поглощения растворов комплексов БЭ с дц-ДНК (наверху) и чистого БЭ (внизу). Концентрация БЭ в растворе – $6 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация ДНК изменялась в интервале $0 \leq r \leq 1 \cdot 10^{-3}$ М. Цифры 1-26 соответствуют комплексам БЭ с ДНК при различных соотношениях их концентраций.

б. Кривая связывания в БЭ с ДНК в координатах Скетчарда, полученная из анализа приведенных спектров.

Аналогичные исследования проведены методом дифференциальной спектроскопии в видимой области поглощения растворов. Спектры поглощения раствора комплексов БЭ с ДНК были зарегистрированы против спектров поглощения раствора чистого лиганда (дифференциальное поглощение), (рис. 2, а, в интервале изменения длины волны $400 \leq \lambda \leq 600$ нм). Как видно из приведенного рисунка, по мере увеличения концентрации ДНК в исследуемом образце раствора БЭ на спектрах поглощения обнаруживаются максимумы при $\lambda = 540$ нм, которые соответствуют только связанным с ДНК молекулам БЭ (кривые 1-26). При $\lambda = 480$ нм обнаруживается отрицательное поглощение, что обусловлено тем, что в исследуемом образце концентрация свободных молекул БЭ уменьшается по сравнению с раствором чистого лиганда, поскольку при увеличении концентрации ДНК все больше молекул БЭ связывается с ней (кривые 1-26). Из рисунка также видно, что на спектрах поглощения появляется изобестическая точка при $\lambda = 515$ нм, наличие которой является веским доводом в пользу того, что в условиях данного эксперимента молекулы БЭ находятся в двух состояниях — связанном и свободном. Необходимо отметить, что на спектрах поглощения комплексов БЭ с ДНК при абсорбционном методе исследования максимумы при $\lambda = 540$ нм при низких концентрациях ДНК не обнаруживаются. На рис. 2, б приведены спектры дифференциального поглощения чистого БЭ. В контрольном образце концентрация лиганда оставалась постоянной, а в измеряемом менялась при титрации раствором $0.1 \times SSC$.

Как видно из рис. 2, на спектрах дифференциального поглощения БЭ обнаруживается только отрицательное изменение при длине волны 480 нм, что обусловлено разбавлением измеряемого раствора, в то время как при длине волны $\lambda \geq 500$ нм пики не обнаруживаются. Необходимо отметить, что абсолютные значения отрицательного изменения поглощений на дифференциальных спектрах чистого раствора БЭ при 480 нм намного меньше, чем значения поглощений комплексов БЭ с ДНК при соответствующих концентрациях лиганда. Исходя из этого мы полагаем, что максимумы при $\lambda = 540$ нм соответствуют поглощению только связанных с ДНК, а минимумы при $\lambda = 480$ нм — только свободных молекул БЭ. Следовательно, из значений поглощений при $\lambda = 480$ и $\lambda = 540$ нм можно количественно и с высокой точностью определить концентрации свободных и связанных молекул БЭ. На основании вольтамперограмм и дифференциальных спектров комплексов БЭ-ДНК получены кривые связывания лиганда с макромолекулой в координатах Скетчарда (рис. 1, б и рис. 2, б).

Несмотря на качественные различия методов ДС и ДИВ, полученные в обоих случаях кривые связывания БЭ с ДНК нелинейные, что является

результатом связывания лиганда по крайней мере двумя способами – интеркаляционным и электростатическим.

На основании полученных данных определены параметры связывания БЭ с ДНК – K и n , обобщенные в табл. 1. Из табличных данных видно хорошее согласие значений параметров связывания интеркаляционным и электростатическим способами, измеренных двумя методами – ДС и ДИВ. Значения n , соответствующие этим способам при связывании БЭ с ДНК, также совпадают друг с другом. В то же время анализ данных работы [4] с помощью уравнения (2) выявил, что аналогичные значения K , полученные абсорбционным и флуориметрическим методами, примерно в 7-8 раз меньше таковых, полученных методами ДС и ДИВ.

Таблица 1

Термодинамические параметры связывания БЭ с ДНК, полученные методами ДС и ДИВ

Параметры	УФ-Вид. дифференциальная спектроскопия	Дифференциальная импульсная вольтамперметрия
$K_{\text{и}} \cdot 10^{-5} \text{ М}^{-1}$	9.00 ± 0.50	9.20 ± 0.05
$K_{\text{пи}} \cdot 10^{-5} \text{ М}^{-1}$	0.40 ± 0.10	—
$K_{\text{эл}} \cdot 10^{-5} \text{ М}^{-1}$	0.20 ± 0.05	0.50 ± 0.05
$n_{\text{и}}$	11.5 ± 0.5	10.5 ± 0.5
$n_{\text{пи}}$	7.0 ± 0.2	—
$n_{\text{эл}}$	2.5 ± 0.2	2.0 ± 0.2

$K_{\text{и}}$ – константа связывания, соответствующая интеркаляционному способу;

$K_{\text{пи}}$ – константа связывания, соответствующая полуинтеркаляционному способу;

$K_{\text{эл}}$ – константа связывания, соответствующая электростатическому способу;

$n_{\text{и}}$ – число оснований, приходящихся на одно место связывания интеркаляционным способом;

$n_{\text{пи}}$ – число оснований, приходящихся на одно место связывания полуинтеркаляционным способом;

$n_{\text{эл}}$ – число оснований, приходящихся на одно место связывания электростатическим способом.

Методом ДС также выявлено, что имеют место три способа взаимодействия БЭ с ДНК – интеркаляционный, полуинтеркаляционный и электростатический, как это было показано в работе [4], где определены значения K и n для этих способов (табл. 1). На существование полуинтеркаляционного способа указывает тот факт, что на кривой связывания БЭ с ДНК, полученной с помощью уравнения (1) из дифференциальных спектров поглощения, все три способа взаимодействия отчетливо проявляются (см. рис. 2, б), в то

время как на кривой связывания, полученной из данных вольтамперограмм комплексов БЭ с ДНК (рис. 1, b), третий (полуинтеркаляционный) способ практически не выражен. Тем не менее, хорошее совпадение значений $K_{\text{инт}}$ и $K_{\text{эл}}$, полученных двумя методами (ДС и ДИВ), указывает на то, что дифференциальные методы исследования, являясь более точными при исследованиях взаимодействия лигандов с ДНК, позволяют получить более достоверную информацию. При этом впервые методом ДС прямо из эксперимента выявляется полуинтеркаляционный способ связывания, который, возможно, маскируется и практически не проявляется при исследовании другими методами (см. [4]).

Таким образом, из полученных результатов можно заключить, что при низких концентрациях молекулы БЭ связываются с дц-ДНК интеркаляционным способом. При увеличении соотношения БЭ/ДНК начинает проявляться полуинтеркаляционный способ связывания, а при более высоких значениях соотношений концентраций БЭ/ДНК проявляется слабый, электростатический способ связывания.

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что различные способы связывания БЭ с ДНК, существование которых было теоретически обосновано в работе [5], обнаруживаются в результате различных экспериментальных исследований. Сопоставление данных этих исследований позволяет заключить, что, сочетая методы ДС и ДИВ с другими, можно выявить несколько способов взаимодействия лиганда с ДНК и определить соответствующие термодинамические параметры связывания.

Выражаем благодарность С.Г.Минасяну за оказанную помощь при осуществлении данной работы.

¹Ереванский государственный университет

²Институт химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН РА

П.О. Вардеванян, А.П. Антонян, К.В. Пирумян, Л.А. Тавадян

Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК спектральным и электрохимическим методами

Исследовано взаимодействие бромистого этидия (БЭ) с ДНК тимуса теленка спектральным и электрохимическим методами при ионной силе раствора 0.02 М $[\text{Na}^+]$, в интервале изменения соотношения концентраций $r_b = \text{лиганд/ДНК} - 0 \leq r_b \leq 0.5$. Выявлено, что БЭ с ДНК связывается тремя способами:

интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим. Определены параметры взаимодействия этими способами – значения констант связывания K и число пар оснований n , приходящихся на одно место связывания.

Պ. Ն. Վարդևանյան, Ա. Պ. Անտոնյան, Բ. Վ. Փիրումյան, Լ. Ա. Թավադյան

ԴՆԹ-ի հետ էթիդիումի բրոմիդի փոխազդեցության հետազոտությունը սպեկտրալ և էլեկտրաքիմիական մեթոդներով

Հետազոտվել է հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի հետ էթիդիում բրոմիդի (ԷԲ) փոխազդեցությունը սպեկտրաֆոտոմետրիկ և էլեկտրաքիմիական մեթոդներով՝ 0.02 մոլ $[Na^+]$ իոնական ուժով լուծույթում, $r_b = \text{լիգանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերության փոփոխության } 0 \leq r_b \leq 0.5$ միջակայքում: Բացահայտվել է, որ ԷԲ-ն ԴՆԹ-ի հետ փոխազդում է երեք եղանակով՝ ինպերլալյացիոն, կիսաինպերլալյացիոն և էլեկտրաստատիկ: Որոշվել են նշված եղանակներով փոխազդեցության պարամետրերը՝ կապման հաստատունի՝ K -ի, և կապման մեկ տեղին համապարասխանող գույգ հիմքերի թվի՝ n -ի արժեքները:

P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, K.V. Pirumyan, L.A. Tavadyan

Study of Ethidium Bromide Interaction with DNA by Spectral and Electrochemical Methods

Calf thymus DNA interaction with ethidium bromide (EtBr) has been investigated by the spectroscopic and electrostatic methods in the interval of ionic strength of 0.02 M $[Na^+]$ and $r_b = \text{ligand/DNA} - 0 \leq r_b \leq 0.5$ ratio. It has been revealed that EtBr interacts with DNA by three modes: intercalative, semi-intercalative and electrostatic. Binding parameters of interaction corresponded to these modes: the values of binding constants – K , as well as the binding site sizes – n have been obtained.

Литература

1. Lane A.N., Jenkins T.C. - Q. Rev. Biophys. 2000. V. 33. N3. P. 255-306.
2. Chaires J.B. - Biopolymers. 1998. V. 44. P. 201-215.
3. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. - Exp. and Mol. Medicine. 2001. V. 33. N4. P. 205-208.
4. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. - Exp. and Mol. Medicine. 2003. V. 35. N6. P. 527-533.
5. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. - J.Biomol. Struct. Dyn. 1996. V. 14. N2. P. 275-283.

6. *Carter M.T., Rodriguez M., Bard A.J.* - J. Amer. Chem. Soc. 1989, V. 111, N24, P. 890-8911.
7. *Ibrahim M.S.* - Analytica Chimica Acta. 2001. V. 443. P. 63-72.
8. *Jurandir R. De Souza, Clarissa S.P. De Castro, Bloch C. Jr* - J. Braz. Chem. Soc. 2000. V. 11. N4. P. 398-404.
9. *Tzyh-Chyang Tang, Hsuan-Jung Huang* - Electroanalysis. 1999. V. 11. N 16. P. 1185-1190.
10. *Minasyan S.H., Tavadyan L.A., Antonyan A.P., Davtyan H.G., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O.* - Bioelectrochemistry. 2006. V. 68. P. 48-55.
11. *Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G.* - J. Biomol. Struct. Dyn. 2000. V. 18. N 2. P. 231-235.