

Інфрачервоні спектри поглинання нуклеїнових кислот: техніка багаторазово порушеного повного внутрішнього відбиття світла

А. В. Степанюгін, О. І. Мартиненко, С. П. Самійленко, Д. М. Говорун

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: dhovorun@imbg.org.ua

Вперше для отримання інфрачервоних спектрів поглинання ДНК і РНК адаптовано техніку багаторазово порушеного повного внутрішнього відбиття світла. Відпрацьовано методіку змивання плівок нуклеїнових кислот з германієвої призми, відсутність якої було основною перешкодою до застосування цієї техніки у випадку нуклеїнових кислот.

Вступ. Інфрачервона (ІЧ) спектроскопія поглинання є одним із найпоширеніших методів дослідження молекулярної будови, що широко застосовується для встановлення структури біомолекул, у тому числі біополімерів, а також для вивчення механізмів перебігу різноманітних біохімічних процесів, зокрема, структурних переходів нуклеїнових кислот (НК), спричинених змінами фізико-хімічних властивостей оточення чи взаємодією з лігандами різної природи [1, 2].

Поруч з традиційним способом отримання ІЧ спектрів поглинання шляхом вимірювання пропускання світла, що проходить через зразок, набула розвитку техніка порушеного повного внутрішнього відбиття (ППВВ) (англійською мовою ATR — attenuated total reflection) світла [3—5]. Суть цієї методики полягає в тому, що при повному внутрішньому відбитті промінь світла проникає з оптично прозорого середовища більшої густини (показник заломлення n_1) у середовище меншої густини (показник заломлення $n_2 < n_1$) на глибину порядку довжини хвилі λ . Порушення повного внутрішнього відбиття спостерігається тоді, коли коефіцієнт відбиття світла від поверхні розділу середовищ R стає меншим за одиницю внаслідок поглинання у шарі товщиною порядку λ середовища

меншої густини. Реєстрація залежності коефіцієнта відбиття $R = I/I_0$ (I_0 — інтенсивність падаючого світла, I — інтенсивність відбитого світла) за допомогою спектральних приладів дає спектр ППВВ речовини меншої густини, який характеризує її абсорбційні властивості [3—5].

При потребі підвищити інтенсивність спектра ППВВ (при слабкому поглинанні або малій кількості речовини, за наявності дуже тонких плівок і т. п.) застосовують метод багаторазово порушеного повного внутрішнього відбиття (БППВВ) світла, котрий забезпечує більшу чутливість, а в деяких випадках і вищу точність порівняно з традиційною ІЧ спектроскопією пропускання [4]. В цьому разі збільшення числа відбиттів еквівалентне збільшенню товщини зразка в ІЧ спектроскопії пропускання. Техніка ППВВ має також переваги при дослідженні речовин з високою абсорбційною здатністю за рахунок можливості реалізувати тонкий шар, у якому відбувається поглинання світла. Цю методику використовують, зокрема, при дослідженні поверхневого стану речовин, адсорбованих на поверхні молекул і в аналітичній практиці [3, 4].

Оснащення серійних ІЧ спектрометрів приставками БППВВ створило можливість безпосередньо вивчати хімічні, фізико-хімічні та біохімічні процеси, які відбуваються в середовищах, недоступних для дослідження традиційними методами. З часом техніка БППВВ набула широкого застосування в

молекулярній біології і біохімії [6—8]. Серед численних молекулярних та надмолекулярних об'єктів дослідження слід назвати пептиди та білки різної природи (мембранні, вірусні, плазми крові та ін.), ліпіди, фосfolіпіди, гормони, рецептори, бактеріородопсин, комплекси антиген—антитіло, шкіру, оболонку зерна і т. п.

Із здивуванням констатуємо, що ретельно переглянувши літературу щодо застосування техніки ІЧ БППВВ світла до вивчення біологічних об'єктів, ми не знайшли прикладів її використання для дослідження НК. Хоча за допомогою традиційної ІЧ спектроскопії пропускання отримували досить якісні спектри НК у стані орієнтованої чи аморфної плівки [9—13]. Однак зазначимо, що основними недоліками є значні витрати матеріалу та тривалий час приготування зразка.

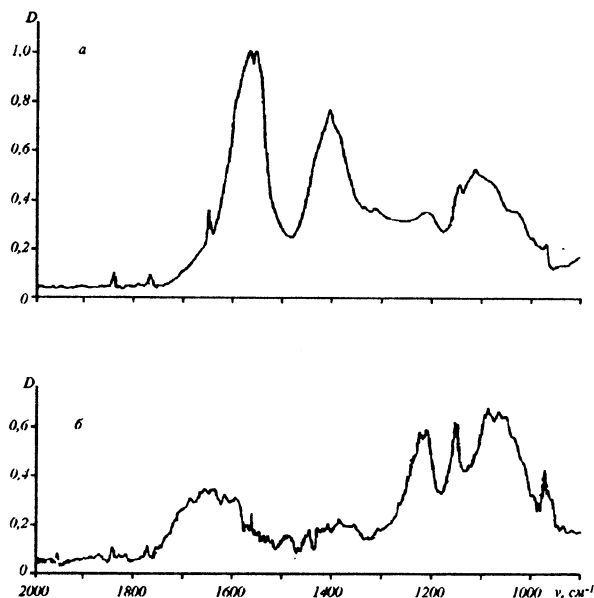
Це повідомлення присвячене отриманню ІЧ спектрів поглинання ДНК та РНК із застосуванням техніки БППВВ світла.

Матеріали і методи. В роботі використано ДНК фага λ («Биопол», Російська Федерація) та сумарний препарат РНК з листя *Kalanchoe daigremontiana*, виділеної за методикою [14]. ІЧ спектри БППВВ реєстрували ІЧ спектрофотометром *Specord M-80* («Carl Zeiss», Німеччина) за допомогою стандартної приставки до UR-10 та UR-20 з германієвою призмою розміром 49 мм \times 25 мм \times 2 мм. Кут між її гранями та кут внутрішнього відбиття дорівнюють 45°. Коефіцієнт відбиття призми — 24, область пропускання 800 — 5500 cm^{-1} .

Плівки ДНК та РНК формували на робочій поверхні призми кристалічного германію випаровуванням водного розчину, прискореного потоком теплого повітря. Потрібну площу плівок отримували за допомогою спеціально виготовленого з тефлону набору шаблонів. З наведених на рисунку спектрів вираховано спектральний внесок робочої поверхні германієвої призми.

Результати і обговорення. В області 4000—900 cm^{-1} зареєстровано досить інтенсивні ІЧ спектри поглинання ДНК фага λ та сумарної РНК, виділеної з листя *Kalanchoe daigremontiana* (рисунок), які за своєю якістю не поступаються аналогічним спектрам, отриманим традиційною ІЧ спектроскопією пропускання в стані плівки [9, 13].

Наголошуємо, що каменем спотикання при застосуванні техніки БППВВ світла для отримання ІЧ спектрів поглинання виявився етап зняття плівки НК з германієвої призми. Ми гадаємо, що саме це є причиною відсутності в літературі даних щодо ІЧ спектрів БППВВ нуклеїнових кислот. Ефективно змити зразки вдалося лише за допомогою буферу такого складу: 10 мМ трис-НСl, рН 8, 5 мМ



Інфрачервоні спектри багаторазово порушеного повного внутрішнього відбиття нуклеїнових кислот: *a* — сумарний препарат РНК з листя *Kalanchoe daigremontiana*; *b* — ДНК фага лямбда

NaCl, 1 мМ ЕДТА і за температури, що перевищує 40 °С.

Отже, наші набутки, викладені в цьому повідомленні, дозволяють долучити НК до переліку біооб'єктів, ІЧ спектри поглинання яких можна досліджувати за допомогою БППВВ світла, використовуючи незаперечні переваги згаданої методики.

A. V. Stepanyugin, O. I. Martynenko, S. P. Samijlenko, D. M. Hovorun

Infrared absorption spectra of nucleic acids: the attenuated total reflection technique

Summary

For the first time the attenuated total reflection (ATR) technique has been applied to obtain the IR absorption spectra of DNA and RNA. The procedure of removing NA films from a germanium prism has been worked through, thus a main obstacle in an application of this technique to nucleic acids has been overcome.

A. V. Степанюгин, Е. И. Мартыненко, С. А. Самойленко, Д. Н. Говорун

Инфракрасные спектры поглощения нуклеиновых кислот: техника многократно нарушенного полного внутреннего отражения света

Резюме

Впервые для получения инфракрасных спектров поглощения ДНК и РНК адаптирована техника многократно нарушенного

полного внутреннего отражения света. Отработана методика смывания пленок нуклеиновых кислот с германиевой призмы, отсутствие которой было основным препятствием применения этой техники в случае нуклеиновых кислот.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tsuboi M. Infrared and Raman spectroscopy // Basic principles in nucleic acid chemistry / Ed. P. O. P. T'so.—New York, London: Acad. press, 1974.—Vol. 1.—P. 399—452.
2. Parker F. S. Application of infrared, Raman, and resonance Raman spectroscopy in biochemistry.—New York, London: Plenum press, 1983.—550 p.
3. Харрик Н. Спектроскопия внутреннего отражения.—М.: Мир, 1970.—335 с.
4. Якушин В. И., Струков О. Г. Спектроскопия внутреннего отражения. Применение в химии и промышленности // Успехи химии.—1972.—41, № 8.—С. 1504—1535.
5. Золотарев В. М., Лыгин В. И., Тарасевич Б. Н. Спектры внутреннего отражения поверхностных соединений и адсорбированных молекул // Успехи химии.—1981.—50, № 1.—С. 26—53.
6. Viano C., Manciu L., Buysse F., Goormaghtigh E., Ruysschaert M. Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the structure, orientation and tertiary structure changes in peptides and membrane proteins // Biopolymers.—2000.—55, N 5.—P. 373—380.
7. Hofer P., Fringeli U. P. Structural investigation of biological material in aqueous environment by means of infrared — ATR spectroscopy // Biophys. Struct. Mech.—1979.—6, N 1.—P. 67—80.
8. Rothschild K. J. FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model // J. Bioenerg. Biomembr.—1992.—24, N 2.—P. 147—167.
9. Малеев В. Я., Семенов М. А., Гасан А. И., Кашпур В. А. Физические свойства системы ДНК—вода // Биофизика.—1993.—38, № 5.—С. 768—790.
10. Семенов М. А., Большух Г. В., Сагайдакова Н. Н., Малеев В. Я. Гидратация и структурное состояние полупротонированной полицитидиловой кислоты в пленках // Биофизика.—2000.—45, № 1.—С. 32—39.
11. Сухоруков Б. И., Сухоруков Г. Б., Шабарчина Л. И., Монтрель М. М. Оптические свойства и структура лэнгмюровских пленок комплексов нуклеиновых кислот с липидами и синтетическими молекулами. II. ИК-спектры, гидратация и конформационное состояние ДНК в мультислойной лэнгмюровской пленке ее комплекса с октадециламином // Биофизика.—1996.—41, № 5.—С. 1016—1025.
12. Семенов М. А., Гасан А. И., Большух Т. В., Малеев В. Я. Гидратация и структурные переходы из *Micrococcus lysodeikticus* в пленках // Биофизика.—1996.—41, № 5.—С. 1007—1015.
13. Семенов М. А., Сухоруков Б. И., Малеев В. Я., Шабарчина Л. И. Исследование температурной аномалии воды, сорбированной на ДНК, методом ИК спектроскопии // Биофизика.—1979.—24, № 2.—С. 210—216.
14. Raha S., Merante F., Protean G., Reed J. K. Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride // Gen. Anal.—1990.—7, N 7.—P. 173—177.

УДК 573.3

Надійшла до редакції 01.04.02