



УДК 547.963.32.04

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ  
С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ,  
СОДЕРЖАЩИМИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНУЮ МЕТКУ****I. АБСОРБИЦИОННЫЕ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА СОПОЛИМЕРОВ  
АДЕНИЛОВОЙ И 1,N<sup>6</sup>-ЭТЕНОАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТ***Разживин А. П., Леднева Р. К., Терганова Г. В.,  
Борисов А. Ю., Богданов А. А.**Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова***Кост А. А.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Разработан спектрофотометрический метод определения содержания 1,N<sup>6</sup>-этенoadениновых остатков и коэффициентов молярной экстинкции  $\text{polu}(A, \epsilon A)$ . Исследована зависимость некоторых абсорбционных и флуоресцентных характеристик  $\text{polu}(A, \epsilon A)$  от степени модификации. Показано, что  $\text{polu}(\epsilon A)$  имеет  $\epsilon_{257} (3,55 \pm 0,15) \cdot 10^3$ ,  $pK_a$  5,3 и квантовый выход флуоресценции около 0,02 от квантового выхода  $\epsilon AMP$ . В  $\text{polu}(A, \epsilon A)$  происходит перенос энергии возбуждения с адениновых на этеноадениновые остатки. Распределение остатков 1,N<sup>6</sup>-этенoadенина вдоль цепи  $\text{polu}(A, \epsilon A)$  отличается от случайного и зависит от условий проведения реакции модификации  $\text{polu}(A)$  хлорацетальдегидом. Спектры КД  $\text{polu}(A, \epsilon A)$  представляют собой в первом приближении сумму спектров пар идентичных хромофоров —  $ArA$  и  $\epsilon Ar\epsilon A$ .

Репортерные группы, обладающие характерными спектральными свойствами, находят широкое применение в структурных исследованиях. Одним из перспективных путей введения флуоресцентной метки в полинуклеотиды является реакция адениновых и цитозиновых остатков с хлорацетальдегидом с образованием соответствующих этенопроизводных [1]. Можно надеяться, что производные этеноаденина будут полезны при решении вопросов нуклеиново-белкового взаимодействия вследствие их спектральных свойств, позволяющих избирательно возбуждать и регистрировать флуоресценцию этеноаденинового хромофора в смесях белков и нуклеиновых кислот [2—4].

Ранее было показано, что взаимодействие белка вируса табачной мозаики с некоторыми полинуклеотидами, например с  $\text{polu}(A)$ , приводит к образованию вирусоподобных рибонуклеопротеидов [5]. Это обстоятельство открывает возможность введения в такие рибонуклеопротеиды флуоресцентной метки — этеноаденинового и этеноцитозинового оснований.

В данной работе описывается спектрофотометрический метод определения степени модификации и коэффициента молярной экстинкции препаратов  $\text{polu}(A, \epsilon A)$ , а также результаты изучения зависимости некоторых флуоресцентных и абсорбционных характеристик сополимеров  $\text{polu}(A, \epsilon A)$  от степени модификации. Флуоресцентные свойства комплексов белка

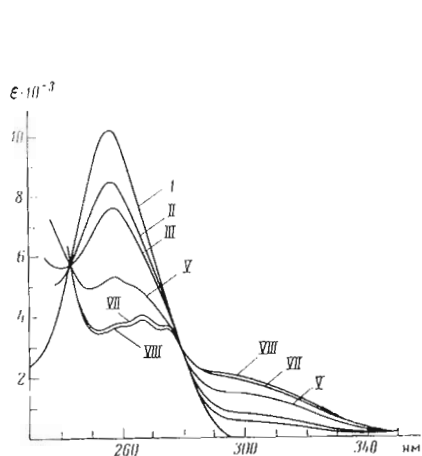


Рис. 1

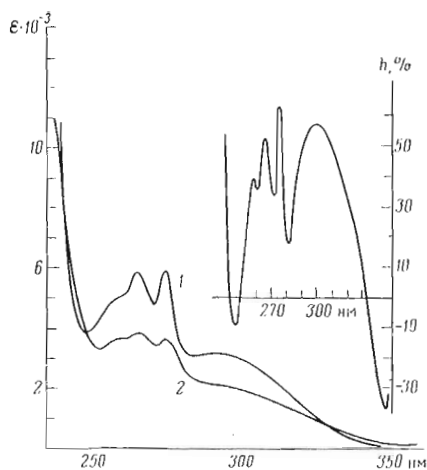


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения poly(A) (I) и сополимеров poly(A, εA) с разной степенью модификации в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,2. Спектры пронумерованы согласно таблице

Рис. 2. Спектр поглощения εAMP в нейтральной среде (I) и рассчитанный спектр poly(εA) (2). На вставке представлена спектральная зависимость гипохромизма poly(εA), полученная по формуле

$$h = \frac{\epsilon_{\text{εAMP}} - \epsilon_{\text{poly(εA)}}}{\epsilon_{\text{poly(εA)}}} \cdot 100, \%$$

вируса табачной мозаики с poly(A, εA) и poly(C, εC) приведены в последующих работах\*.

На рис. 1 представлены спектры поглощения poly(A), а также сополимеров poly(A, εA) с различным содержанием модифицированных оснований, полученных путем обработки poly(A) хлорацетальдегидом. Увеличение степени модификации poly(A) у образцов I—VIII сопровождается уменьшением поглощения в полосе аденина, одновременно возрастает поглощение в длинноволновой области (280—350 нм), характерное для этеноаденина. Семейство кривых имеет две изобестические точки (при  $243 \pm 1$  и  $280 \pm 0,5$  нм с коэффициентами молярной экстинкции  $(5,7 \pm 0,2) \cdot 10^3$  и  $(2,8 \pm 0,1) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  соответственно), что указывает на существование в составе сополимеров poly(A, εA) только двух типов хромофоров, поглощающих свет независимо друг от друга. В таком случае спектр поглощения любого сополимера poly(A, εA) может быть представлен в виде линейной комбинации спектров poly(A) и poly(εA), относительный вклад каждого из которых зависит от степени модификации сополимера. Это утверждение можно записать в виде уравнения для некоторой длины волны  $\lambda_1$  (например, равной 257 нм), затем для  $\lambda_2$  (300 нм) и, решая полученную систему уравнений, получить:

$$\epsilon_{\text{poly(A,εA)}}^{257} = \frac{\epsilon_{\text{poly(A)}}^{257} \epsilon_{\text{poly(εA)}}^{300}}{\epsilon_{\text{poly(εA)}}^{300} + \frac{D_{\text{poly(A,εA)}}^{300}}{D_{\text{poly(A,εA)}}^{257}} [\epsilon_{\text{poly(A)}}^{257} - \epsilon_{\text{poly(εA)}}^{257}]} \quad (1)$$

$$x = \frac{\epsilon_{\text{poly(A)}}^{257} - \epsilon_{\text{poly(A,εA)}}^{257}}{\epsilon_{\text{poly(A)}}^{257} - \epsilon_{\text{poly(εA)}}^{257}}, \quad (1a)$$

\* Сообщение II см. [6], III — в следующем номере журнала. В сокращенном виде результаты сообщений I — III были опубликованы в работе [17].

Коэффициенты молярной экстинкции и степень модификации  $\kappa$  препаратов poly(A,  $\epsilon$ A) (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2)

Параметр	Способ определения	I	II	III	IV
$\epsilon_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{257} \cdot 10^{-3}$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	по фосфору	9,58±0,2	8,35±0,2	7,79±0,3	6,69±0,2
	уравнение (2)	9,48±0,19	8,39±0,15	7,61±0,14	6,49±0,13
$\kappa$	уравнение (2a)	0,094±0,040	0,261±0,033	0,380±0,029	0,551±0,027
	уравнение работы [11]	—	0,35	0,47	—

Параметр	Способ определения	V	VI	VII	VIII	poly(A)
$\epsilon_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{257} \cdot 10^{-3}$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	по фосфору	5,15±0,3	4,36±0,2	3,71±0,2	3,72±0,3	10,1±0,2
	уравнение (2)	5,29±0,13	4,31±0,12	3,75±0,13	3,64±0,14	
$\kappa$	уравнение (2a)	0,734±0,027	0,830±0,028	0,969±0,029	0,987±0,029	
	уравнение работы [11]	0,84	—	1,02	1,08	

Где  $\epsilon_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{\lambda}$ ,  $\epsilon_{\text{poly(A)}}^{\lambda}$ ,  $\epsilon_{\text{poly(\epsilon A)}}^{\lambda}$  — коэффициенты молярной экстинкции соответствующих полипуклеотидов при длине волны  $\lambda$ ,  $D_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{300}/D_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{257}$  — отношение оптических плотностей препарата poly(A,  $\epsilon$ A) при 300 и 257 нм,  $\kappa$  — доля этенодениновых оснований в данном сополимере (степень модификации). Значение  $\epsilon_{\text{poly(A)}}^{257}$ , определенное в данной работе, равно  $(10,1 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , что совпадает с литературными данными [7]. Сведения о коэффициенте молярной экстинкции poly( $\epsilon$ A) в литературе отсутствуют, поэтому мы провели расчет величин  $\epsilon_{\text{poly(\epsilon A)}}^{257}$  и  $\epsilon_{\text{poly(\epsilon A)}}^{300}$  по уравнению (1) на основе найденных значений  $\epsilon_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{257}$  для ряда сополимеров и отношения  $D_{\text{poly(\epsilon A)}}^{300}/D_{\text{poly(\epsilon A)}}^{257}$ , равного  $0,56 \pm 0,01$  согласно приведенному в работе [8] спектру препарата poly( $\epsilon$ A), синтезированного из  $\epsilon$ ADP ферментативным путем. Рассчитанные значения  $\epsilon_{\text{poly(\epsilon A)}}^{257}$  и  $\epsilon_{\text{poly(\epsilon A)}}^{300}$  оказались равными  $(3,55 \pm 0,15) \cdot 10^3$  и  $1,988 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  соответственно. Подставляя численные величины в уравнения (1) и (1a), можно получить удобные расчетные формулы:

$$\epsilon_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{257} = \frac{20,08 \cdot 10^3}{1,988 + 6,55 \cdot \frac{D_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{300}}{D_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{257}}}, \quad (2)$$

$$\kappa = \frac{10,1 - \epsilon_{\text{poly(A, \epsilon A)}}^{257} \cdot 10^{-3}}{6,55}. \quad (2a)$$

В таблице приведены коэффициенты молярной экстинкции и степени модификации некоторых препаратов  $\text{poly}(A, \epsilon A)$ , рассчитанные по уравнениям (2) и (2а).

Для проверки правильности принятого для  $\epsilon_{\text{poly}(\epsilon A)}^{257}$  значения  $3,55 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , являющегося опорным при расчетах по уравнениям (2) и (2а), препарат  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  с высокой степенью модификации (VII, таблица) был тщательно проанализирован. Хроматографическое определение продуктов кислотного гидролиза полинуклеотида не выявило присутствия немодифицированных адениновых оснований. Точность метода позволяет считать, что степень модификации препарата (VII) составляет не менее 0,95, что хорошо согласуется с вычисленным для него значением  $\chi$ , равным  $0,97 \pm 0,03$ . Аналогичное соответствие получено и для коэффициента молярной экстинкции этого препарата — значения, определенные по содержанию фосфора и рассчитанные по уравнению (2), практически совпадают.

Таким образом, по уравнению (2) и (2а) можно рассчитать коэффициент молярной экстинкции и степень модификации любого сополимера  $\text{poly}(A, \epsilon A)$ , располагая лишь его спектром поглощения.

Ранее Стейнер и др. [9] для оценки степени модификации сополимеров  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  использовали уравнение, основанное на допущении, что величины гипохромизма  $\text{poly}(A)$  и  $\text{poly}(\epsilon A)$  при 260 нм совпадают. Мы рассчитали значения  $\chi$  для ряда препаратов  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  по этому уравнению и установили, что получающиеся величины примерно на 10% выше, чем по уравнению (2а). Это расхождение может объясняться тем, что гипохромизм при 260 нм  $\text{poly}(\epsilon A)$  несколько ниже, чем у  $\text{poly}(A)$ .

Как видно из рис. 2, спектр поглощения  $\text{poly}(\epsilon A)$  в нейтральной среде имеет плечо при 259 нм ( $3,65 \cdot 10^3$ ), максимумы при 266 ( $3,9 \cdot 10^3$ ), 275 ( $3,65 \cdot 10^3$ ) и плечо в области 280—320 нм ( $2,0 \cdot 10^3$  при 300 нм). Сравнение спектров полинуклеотида и мономера показывает, что полимеризация приводит к значительному уменьшению молярного поглощения во всех длинноволновых пиках, при этом положение максимумов практически не изменяется. Наличие значительного гипохромизма свидетельствует о сильном взаимодействии этеноадениновых оснований в полинуклеотиде.

Кривая зависимости интенсивности флуоресценции  $\text{poly}(\epsilon A)$  ( $\chi=0,98$ ) от pH среды (данные не приводятся) имеет точку перегиба при pH 5,3 ( $pK_a$  для  $\epsilon\text{AMP}$  равно 4,2—4,4 [10]), что указывает на структурную перестройку  $\text{poly}(\epsilon A)$  в кислой среде.

Для выяснения вопроса о структуре сополимеров и свойствах их этеноадениновых оснований было проведено изучение флуоресцентных характеристик и КД в зависимости от степени модификации.

Серия спектров возбуждения флуоресценции полинуклеотидов с разными степенями модификации представлена на рис. 3. Из сопоставления спектров возбуждения флуоресценции  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  со спектрами поглощения  $\text{poly}(A)$  и  $\text{poly}(\epsilon A)$  следует, что возбуждение этеноаденинового хромофора в составе сополимера может происходить при поглощении им кванта света или при передаче энергии возбуждения с поглотившего кванта света аденинового основания. При высоких степенях модификации полинуклеотида доминирует первый процесс, и спектр возбуждения флуоресценции сополимера имеет полосы, характерные для спектра поглощения этеноаденинового хромофора. При низких степенях модификации значителен вклад второго процесса — передачи энергии с адениновых оснований, и в спектре возбуждения флуоресценции  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  появляется интенсивная полоса, соответствующая полосе поглощения аденина.

Некоторая информация о процессе передачи энергии поглощенного кванта света с аденинового остатка на этеноадениновый в составе  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  была получена при применении воздействий, нарушающих межплоскостные взаимодействия оснований в полинуклеотидах. Из рис. 4

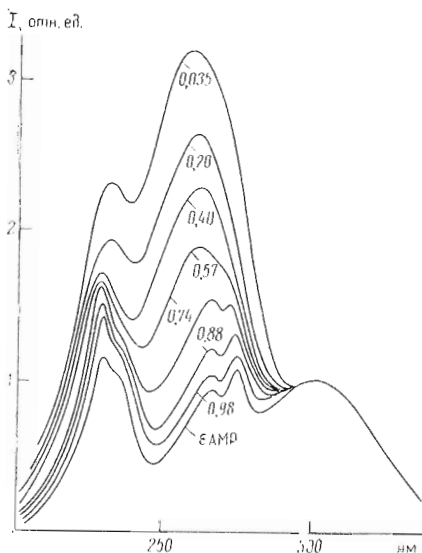


Рис. 3

Рис. 3. Некорректированные спектры возбуждения флуоресценции  $\epsilon$ AMP и сополимеров poly(A,  $\epsilon$ A) с разной степенью модификации. Все спектры нормированы к единице при 300 нм, флуоресценция регистрировалась в максимуме при 410 нм; цифры на спектрах указывают степень модификации препаратов

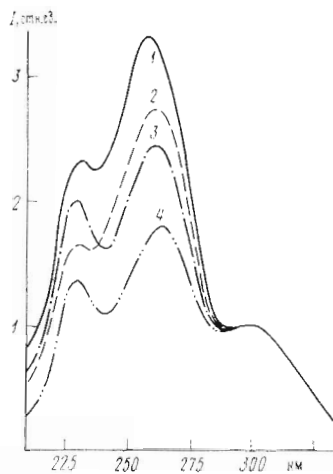


Рис. 4

Рис. 4. Некорректированные спектры возбуждения флуоресценции poly(A,  $\epsilon$ A) ( $\approx 0,16$ ) в воде (1) и в 70% этаноле (2) при 22°; в воде (3) и в 70% этаноле (4) при 85°. Все спектры нормированы к единице при 300 нм

видно, что при повышении температуры и/или при переходе к растворителю с низким поверхностным натяжением полоса спектра возбуждения флуоресценции poly(A,  $\epsilon$ A), соответствующая полосе поглощения аденинового основания, уменьшается. Это означает, что процент этеноадениновых хромофоров, возбуждаемых за счет передачи энергии поглощенного света с адениновых остатков, снижается. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в водной среде сополимеры имеют упорядоченную структуру, стабилизированную взаимодействием адениновых и этеноадениновых оснований вдоль цепи, и сохранение вторичной структуры полинуклеотида является необходимым условием передачи энергии возбуждения.

С увеличением степени модификации полинуклеотида квантовый выход флуоресценции этеноадениновых остатков монотонно падает (см. рис. 5). Зависимость легко экстраполируется к  $\approx 1,0$ . Определяемый таким образом квантовый выход флуоресценции poly( $\epsilon$ A) равен 0,02 от квантового выхода  $\epsilon$ AMP. Приводимое в работе [8] значение 0,024 для квантового выхода poly( $\epsilon$ A) близко к полученному нами. Экстраполяция зависимости к  $\approx 0$  по рис. 5 затруднена вследствие быстрого уменьшения точности измерений квантового выхода при низкой степени модификации. Квантовый выход poly(A,  $\epsilon$ A) при  $\approx$ , стремящейся к нулю, по-видимому, близок к 0,7 от квантового выхода флуоресценции  $\epsilon$ AMP. Мы не располагаем данными о квантовом выходе этеноадениновых остатков для промежуточных состояний. По-видимому, он может быть оценен как 0,1 от квантового выхода  $\epsilon$ AMP — вокруг этой величины колеблются значения квантовых выходов флуоресценции этеноадениновых остатков в составе различных динуклеозидфосфатов [11]. Если пренебречь влиянием несоседних остатков на квантовый выход этеноаденинового основания в poly(A,  $\epsilon$ A), то флуоресцирующие остатки можно разбить на три

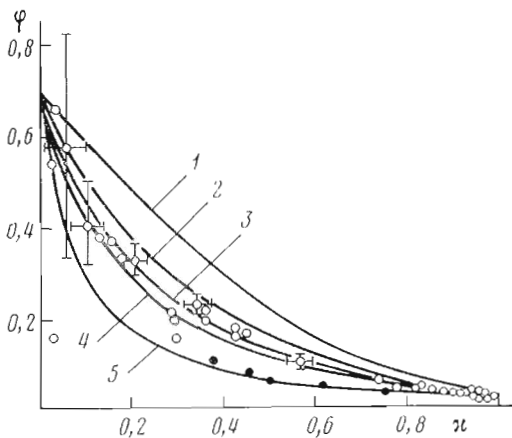


Рис. 5. Зависимость относительного квантового выхода флуоресценции  $\text{polu}(A, \epsilon A)$  от степени модификации. Квантовый выход флуоресценции  $\epsilon A M P$  принят равным единице, длина волны возбуждения флуоресценции 320 нм, длина волны регистрации флуоресценции 410 нм. Непрерывными линиями нанесены теоретические кривые, удовлетворяющие уравнению (3) для  $\varphi_a=0,7$ ,  $\varphi_b=0,1$ ,  $\varphi_c=0,02$  и  $\alpha=1$  (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4) и 10 (5). Светлыми кружками нанесены значения квантового выхода флуоресценции для препаратов  $\text{polu}(A, \epsilon A)$ , приготовленных по методике Б, а темными кружками — для серии препаратов, полученных по методике А (см. «Экспериментальную часть»)

группы: а) этеноадениновые остатки, расположенные между двумя адениновыми остатками, б) между адениновыми и этеноадениновыми остатками и в) между двумя этеноадениновыми остатками. Если  $\varphi_a$ ,  $\varphi_b$  и  $\varphi_c$  — относительные квантовые выходы флуоресценции этеноадениновых остатков, причисленных к этим группам, а  $P_a(x, \alpha)$ ,  $P_b(x, \alpha)$  и  $P_c(x, \alpha)$  — вероятности этих групп, то зависимость выхода флуоресценции  $\text{polu}(A, \epsilon A)$  от степени модификации  $x$  можно найти по уравнению

$$\Phi_{\text{polu}(A, \epsilon A)}(x, \alpha) = \varphi_a P_a(x, \alpha) + \varphi_b P_b(x, \alpha) + \varphi_c P_c(x, \alpha). \quad (3)$$

Вероятности  $P_a(x, \alpha)$ ,  $P_b(x, \alpha)$  и  $P_c(x, \alpha)$  зависят не только от степени модификации сополимеров, но и от параметра  $\alpha$ , показывающего, во сколько раз скорость модификации аденинового остатка, стоящего рядом с этеноадениновым остатком или между двумя этеноадениновыми остатками, выше скорости модификации аденинового остатка, стоящего в окружении адениновых остатков в сополимере. До настоящего времени вероятности  $P_a(x, \alpha)$ ,  $P_b(x, \alpha)$  и  $P_c(x, \alpha)$  не получены в аналитической форме, поэтому мы воспользовались значениями вероятностей, рассчитанными на БЭСМ-ЗМ аналогично работе [12].

На рис. 5 приведены найденные по уравнению (3) зависимости  $\Phi_{\text{polu}(A, \epsilon A)}(x, \alpha)$  для  $\alpha$  от 1 до 10. Видно, что экспериментальные точки удовлетворяют теоретическим кривым для  $\alpha=3$  и  $\alpha$  около 10 для серий образцов  $\text{polu}(A, \epsilon A)$ , приготовленных по методикам Б и А соответственно. Отсюда следует, что квантовый выход флуоресценции этеноаденинового остатка, стоящего между двумя адениновыми остатками в  $\text{polu}(A, \epsilon A)$ , действительно близок к 0,7 от квантового выхода  $\epsilon A M P$ , а распределение модифицированных оснований вдоль цепи отклоняется от случайного. Последнее свидетельствует о том, что вероятность модификации гетероциклического основания рядом с уже модифицированным основанием превышает вероятность модификации основания, расположенного между двумя немодифицированными основаниями, т. е. модификация одного звена в полинуклеотиде облегчает модификацию соседнего.

Однако условия модификации оказывают дополнительное влияние на характер распределения этеноадениновых звеньев в полинуклеотиде: сополимеры, полученные обработкой  $\text{polu}(A)$  хлорацетальдегидом при рН 6,0 и 50° (способ Б), отличаются меньшей степенью сблоченности, чем при модификации в условиях рН 4,5 и 37°. В первом случае  $\text{polu}(A)$  лишена упорядоченной структуры и доступность гетероциклических оснований действию хлорацетальдегида, по крайней мере на первом этапе реакции, сравнительно одинакова. В условиях модификации по методике А  $\text{polu}(A)$  имеет форму двойной спирали. По-видимому, модификация флуоресцирующего аденинового остатка закрепляет локальное распределение двух-

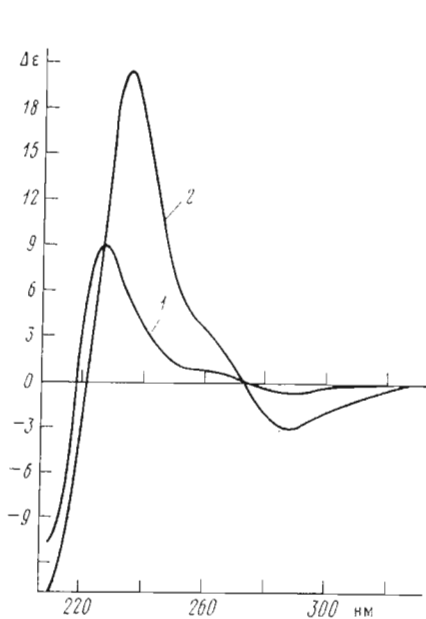


Рис. 6

Рис. 6. Спектры КД  $\text{poly}(\epsilon A)$  ( $\alpha=0.98$ ) в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,2 (1) и pH 5,5 (2)

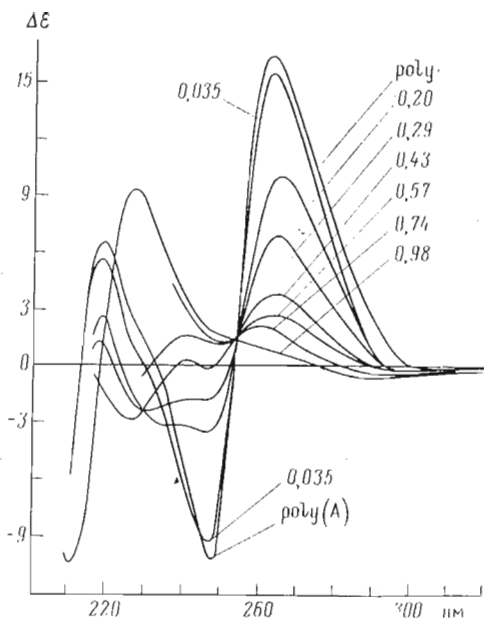


Рис. 7

Рис. 7. Спектры КД  $\text{poly}(A)$  и сополимеров  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  с разными степенями модификации в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,2. Цифры на спектрах указывают степень модификации препаратов

спирального участка, облегчая тем самым модификацию ближайших к нему остатков. Последнее определяет большую сблоченность этеноадениновых остатков в полинуклеотиде, которая выражается в уменьшении квантового выхода флуоресценции сополимера в сравнении с сополимером той же степени модификации, приготовленным по методике Б.

Изучение КД сополимеров показало, что увеличение степени модификации  $\text{poly}(A)$  сопровождается изменением спектра КД полинуклеотида во всем наблюдаемом интервале длин волн (рис. 6). В спектре КД полинуклеотида предельной степени модификации (рис. 6, 7) видны две пары сравнимых по интенсивности полос противоположного знака. Главная полоса малой амплитуды имеет отрицательный знак, и ее максимумы, локализованные в области 280–300 и 250–270 нм, одинаково удалены от точки нулевого перехода, лежащей вблизи одного из длинноволновых максимумов поглощения при 275 нм. Вторая пара полос большой амплитуды имеет положительный и отрицательный максимумы при 227 и 210 нм соответственно и точку нулевого перехода при 218 нм — вблизи интенсивной коротковолновой полосы поглощения этеноаденинового основания в полинуклеотиде (~220 нм). Спектр КД  $\text{poly}(\epsilon A)$ , таким образом, имеет консервативный характер.

Как видно из рис. 7, с увеличением степени модификации  $\text{poly}(A)$  амплитуда КД в полосе поглощения аденина уменьшается и одновременно развивается полоса КД при 227 нм, характерная для этеноаденина. Повидному, все кривые проходят через изодихроичную точку в области ~253,5 нм. Наличие изодихроичной точки, а также параллельное изменение спектра КД справа и слева от нее указывает на существование простого перехода между двумя хромоформами. Анализ кривых на рис. 7 приводит к выводу, что в КД сополимера основной вклад вносят взаимо-

действия в парах  $ArA$  и  $\epsilon Ar\epsilon A$ , спектр КД которых значительно отличается по форме и интенсивности во всем интервале длин волн. Промежуточные пары  $Ar\epsilon A$  и  $\epsilon ArA$  имеют либо очень низкий дихроизм, либо сравнимый по интенсивности дихроизм противоположных знаков. С этой точки зрения становится понятным резкое уменьшение амплитуды первой полосы КД  $\text{poly}(A)$  на ранних стадиях модификации и низкий дихроизм сополимера средней степени модификации  $\text{poly}(A, \epsilon A)$  ( $\chi=0,57$ ). В пользу этого предположения говорит также и тот факт, что сополимеры с большей сблоченностью этеноадениновых остатков, сохраняя характер изменения КД от глубины модификации, имеют более высокий дихроизм, который в большей степени отражает аддитивность вкладов, обусловленных взаимодействием идентичных хромофоров.

Как видно из рис. 6, с понижением рН среды наблюдаются изменения в КД  $\text{poly}(\epsilon A)$ : амплитуды в максимумах увеличиваются, и весь спектр несколько сдвигается в длинноволновую область; консервативность спектра при этом сохраняется. Изменение КД отражает структурный переход, который претерпевает полинуклеотид в результате протонирования оснований.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что, несмотря на некоторые отличия, связанные с изменением электронной структуры гетероциклического основания,  $\text{poly}(\epsilon A)$  и сополимеры этеноадениловой и адениловой кислот во многих отношениях повторяют свойства  $\text{poly}(A)$ . Они принимают в растворе упорядоченную структуру вследствие межплоскостного взаимодействия основания, причем, как следует из наличия высокого гипохромного эффекта,  $\text{poly}(\epsilon A)$  имеет даже более жесткую структуру, чем  $\text{poly}(A)$ . В пользу сильных взаимодействий этеноадениновых оснований говорят также данные рентгеноструктурного анализа: в кристаллах производные этеноаденозина формируют стопки, отличающиеся сильным перекрыванием кольцевых систем соседних молекул [13]. Прямые данные о свойствах и конформации смешанных динуклеотидфосфатов отсутствуют, однако данные по флуоресценции некоторых динуклеозидфосфатов, содержащих этеноаденин [11], а также результаты настоящей работы показывают, что этеноадениновое основание сохраняет способность аденина к внутримолекулярным взаимодействиям в полинуклеотидах. Подобно аденину  $pK_a$  модифицированного основания в полинуклеотидах возрастает от 4,3 (в  $\epsilon AMP$ ) до 5,3, хотя это изменение выражено в меньшей степени, чем для аденина, основность которого в  $\text{poly}(A)$  увеличивается на две единицы  $pK$  — от 3,7 до 5,8. По данным ЯМР [10] и кристаллографии [13], центром протонирования этеноаденинового основания является положение  $N_{(6)}$  исходного аденина, однако положительный заряд делокализован между теми же атомами азота ( $N_{(6)}$  и  $N_{(9)}$ ), что и в аденине. Положительный заряд на  $N_{(1)}$  аденина, как известно, стабилизирует двутяжевую структуру  $\text{poly}(A)$  в кислой среде за счет электростатического взаимодействия с фосфатной группой. По-видимому, этот тип взаимодействия, равно как и образование пары водородных связей  $N_{(1)}H \dots N_{(9)}$ , сохраняется и для протонированного этеноаденина, а изменение спектра КД  $\text{poly}(\epsilon A)$  в кислой среде отражает переход одготяжевой формы в двутяжевую. В случае сополимеров различие в основности аденина и его этеноаналога должно приводить к уменьшению кооперативности этого перехода, что и наблюдали ранее [9], изучая зависимость интенсивности флуоресценции сополимеров с разной степенью модификации от рН среды. Также очевидно, что достройка третьего цикла на аденине уменьшает способность основания к образованию водородных связей и может создавать стерические препятствия для взаимодействия с белками, тем не менее в сравнении с обычными способами введения флуоресцентных меток, связанных с присоединением к основанию объемистых групп, модификация аденина хлорацетальдегидом имеет преимущества.



## Экспериментальная часть

В работе использовали препарат poly(A) (Reanal), очищенный фенольной депротенизацией, и  $\epsilon$ AMP (Serva). Хлорацетальдегид получали хлорированием ацетальдегида по методу [14]. Концентрацию хлорацетальдегида в водных растворах определяли по формуле, предложенной в работе [15].

Модификацию poly(A) проводили в термостатируемой ячейке рН-ста-та «Титрограф ТТТ-II» (Radiometer). Для модификации использовали две методики (А и В), несколько различающиеся по условиям проведения реакции.

А. К раствору 20 мг poly(A) в 20 мл воды, рН 4,5, добавляли 2 мл 2,0 М водного раствора хлорацетальдегида, рН 4,5. Смесь инкубировали при 37° и постоянном перемешивании, поддерживая рН 4,5 автоматической подачей 0,1 М КОН. При этом полная модификация достигалась за 48 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли спектрофотометрически по увеличению оптической плотности раствора в области 300–350 нм. Реакцию в нужный момент прекращали, добавляя к реакционной смеси 3–4 объема этилового спирта. Смесь выдерживали на холоду в течение суток; образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 10 мл воды и подвергали хроматографии на сефадексе G-10. Фракции, содержащие нуклеотидный материал, объединяли и повторно хроматографировали на сефадексе G-100 в воде. Материал, выходящий в нулевом объеме колонки, высушивали лиофильно.

В. К водному раствору poly(A) (70 мг в 33 мл), рН 6,0, приливали 7 мл 2 М водного раствора хлорацетальдегида, рН 6,0. Смесь инкубировали при 50° и постоянном перемешивании, поддерживая значение рН 6,0 автоматической подачей 0,1 М раствора КОН. В этих условиях полной модификации достигали за 5 ч. Полинуклеотидный материал очищали диализом против воды или осаждением спиртом. В последнем случае после двукратного переосаждения из водного раствора препараты сополимеров промывали несколько раз спиртом и эфиром, а затем высушивали на воздухе.

Концентрацию полинуклеотидов определяли по содержанию общего фосфора после минерализации образцов сжиганием с хлорной кислотой [16].

Изучая зависимость флуоресценции от рН среды, большой объем раствора полинуклеотида в деионизованной воде (15–20 мл) титровали микроколичествами концентрированной HCl, начиная с рН 7,2; при этом разбавление не учитывали. Определение рН проводили на рН-метре «рН-340» с точностью  $\pm 0,05$  единицы рН.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Cary-15. Измерения кругового дихроизма проводили на дихрографе Roussel-Jouan II. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции получали на спектрофотометре Aminco-Bowman с термостатированным кюветным отделением, 150-ваттной ксеноновой лампой и фотоумножителем 1Р21 со спектральной характеристикой S-6. Все спектральные измерения проводили в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,2, при 22°, если это не оговаривается особо. При флуоресцентных измерениях оптическое поглощение образцов при длине волны возбуждения составляло менее 0,05 оптической единицы.

Авторы приносят благодарность канд. хим. н. О. В. Ноа (МГУ), канд. физ.-мат. н. П. Б. Васильеву (МГУ) и Л. С. Лукьянову (МГУ) за помощь в выполнении расчетов на ЭВМ и плодотворные обсуждения результатов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kochetkov N. K., Shibaev V. N., Kost A. A. (1971) *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1993–1996.
2. Secrist J. A., III, Barrio J. R., Leonard N. J. (1972) *Science*, **175**, 646–647.
3. Secrist J. A., III, Barrio J. R., Leonard N. J., Weber G. (1972) *Biochemistry*, **11**, 3499–3506.

4. Spencer R. D., Weber G., Tolman G. L., Barrio J. R., Leonard N. J. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **45**, 425-429.
5. Fraenkel-Conrat H., Singer B. (1964) *Virology*, **23**, 354-362.
6. Леднева Р. К., Разживин А. П., Богданов А. А., Кост А. А., Златкин И. В. (1979) *Биоорганич. химия*, **5**, 701-710.
7. Janik B. (1971) *Physicochemical Characteristics of Oligonucleotides and Polynucleotides*, Acad. Press, N. Y.— Washington — London.
8. Lehrach H., Scheit K. H. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **308**, 28-34.
9. Steiner R. F., Kinnier W., Lunasin A., Delac J. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **294**, 24-37.
10. Penzer G. R. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 297-305.
11. Tolman G. L., Barrio J. R., Leonard N. J. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4869-4878.
12. Platé N. A., Litmanovich A. D., Noah O. V., Toom A. L., Vasilyev N. B. (1974) *J. Polymer Sci.*, **12**, 2165-2185.
13. Wang A. H.-J., Damman L. G., Barrio J. R., Paul I. C. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 1205-1213.
14. Патент Японии № 1982 (1954) РЖ «Химия», 1957, № 1, 2085 П.
15. Ясницкий Б. Г., Сатановская Ц. И. (1964) *Ж. общ. химии*, **34**, 1043-1048.
16. Weil-Malherbe H., Green H. (1959) *Biochem. J.*, **49**, 286-295.
17. Ledneva R. K., Razjivin A. P., Kost A. A., Bogdanov A. A. (1979) *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4225-4243.

Поступила в редакцию  
27.VII.1978

После доработки  
9.XI.1978

**INTERACTION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS PROTEIN WITH SYNTHETIC  
POLYNUCLEOTIDES CONTAINING A FLUORESCENCE LABEL. I. OPTICAL  
AND FLUORESCENCE PROPERTIES OF ADENYLIC AND 1,N<sup>6</sup>-ETHENOADENYLIC  
ACID COPOLYMERS**

RAZJIVIN A. P., LEDNEVA R. K., TERGANOVA G. V.,  
BORISOV A. Yu., BOGDANOV A. A., KOST A. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic  
Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;  
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

A spectrophotometric method was developed for determining the 1, N<sup>6</sup>-ethenoadenine content and molar extinction coefficients of poly(A, εA). For this polymer the dependence of some parameters in absorption and fluorescence spectra on the extent of modification was studied. Poly(εA) has  $\epsilon_{257} = (3.55 \pm 0.15) \cdot 10^3$ ,  $pK_a$  5.3 and fluorescence quantum yield that is about 0.02 of that for εAMP. The excitation energy transfer occurs from adenine to 1, N<sup>6</sup>-ethenoadenine residues in poly(A, εA). Distribution of 1, N<sup>6</sup>-ethenoadenine residues in poly(A, εA) differs from random and depends on modification conditions. The CD spectra of poly(A, εA) represent, to a first approximation, the sum of those of pairs with identical chromophores, ApA and εAπεA.