

3. Фиксман Б. А. Светорассеяние взвесей бактерий в видимой области спектра // Биофизика.— 1963.—8, № 3.— С. 380—384.
4. Евдокимов Ю. М., Скуридин С. Г., Акименко Н. М. Жидкокристаллические микрофазы низкомолекулярных двухцепочечных нуклеиновых кислот и синтетических полинуклеотидов // Высокомолекуляр. соединения.— 1984.— А26, № 11.— С. 2403—2410.
5. Protein measurements with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrouh, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem.— 1951.—193, N 1.— P. 265—275.
6. Слоנים И. Я. Определение размера частиц по светорассеянию // Оптика и спектроскопия.— 1970.—8, № 1. — С. 98—108.

Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск
 Ин-т физиологии АН БССР, Минск
 Белорус. гос. ун-т им. В. И. Ленина, Минск
 Ин-т фотобиологии АН БССР, Минск

Получено 10.03.89

STUDIES OF DNA INTERACTION WITH PROTEIN CONTAMINANTS

A. A. Akhrem, V. P. Egorova, A. S. Egorov, V. I. Krot, D. Yu. Lando, Z. A. Luka
 Institute of Bioorganic Chemistry,
 Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk
 Institute of Physiology,
 Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk
 Lenin Byelorussian State University, Minsk
 Institute of Photobiology,
 Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Summary

DNA isolated from the bovine spleen has been investigated for its interaction with protein contaminants. It is shown that the contaminants are not histones and their binding is determined by the nonionic contacts which are destroyed in the presence of urea and retain with high concentrations of NaCl. The protein contaminants do not change thermostability of DNA and they are distributed irregularly among the macromolecules: less than 10 % of DNA contains more than 70 % of all the proteins.

УДК 577.323.425

В. А. Сорокин, В. Л. Галкин, В. А. Валеев,
 Е. С. Архипова, Г. О. Гладченко, Ю. П. Благой

ИЗУЧЕНИЕ ЭНЕРГЕТИКИ ГИДРАТАЦИИ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ УФ-СПЕКТРОСКОПИИ *

Для определения термодинамических параметров гидратации оснований нуклеотидов измерены температурные зависимости дифференциальных УФ-спектров поглощения водных растворов СМР, GMP, UMP, IMP, AMP и Guo. С помощью двухуровневой термодинамической модели вычислены энтальпия (ΔH) и энтропия (ΔS) гидратации молекул воды, образующих внутренний моногидратный слой вблизи оснований. Для UMP, IMP, GMP и Guo гидратация приводит к возрастанию энтропии, которое вносит основной вклад в изменение свободной энергии Гиббса (ΔG). Для СМР энтальпийный и энтропийный члены сравнимы по величине, чем объясняется аномально низкое значение $|\Delta G|$. Обнаружена корреляция между величиной ΔH и значениями дипольного момента основного состояния. Гидратация приводит к возрастанию энергии электронных переходов оснований.

Введение. Для выяснения энергетики специфических взаимодействий ДНК с низкомолекулярными лигандами в водных растворах необходима информация о термодинамических параметрах, характеризующих гидратацию гетероатомов оснований нуклеотидов.

Хотя калориметрия является прямым и наиболее точным методом определения теплот гидратации, она не позволяет разделить вклады,

* Представлена членом редколлегии Н. В. Желтовским.

обусловленные гидратацией отдельных групп: фосфатов, рибозы и оснований, энергетика связывания которых с молекулами воды существенно отличается [1]. Попытка такого разделения [1] была сделана на основании приложения теории сорбции газовой фазы гетерогенными сорбентами к описанию экспериментальных изотерм гидратации, полученных методами ИК-спектроскопии и СВЧ-диэлектротрии. Однако интерпретация теоретических представлений в этом случае достаточно сложна [1]. В связи с этим особый интерес для изучения взаимодействия мономеров нуклеиновых кислот с молекулами растворителя представляет метод температурно-зависимой дифференциальной УФ-спектроскопии [2—4]. УФ-спектроскопия малочувствительна к взаимодействию лигандов (в том числе и молекул воды) с фосфатными группами и рибозой [5]. Наблюдаемые при ее использовании изменения спектров поглощения нуклеотидов должны практически полностью определяться гидратацией оснований в координационном («моногидратном» [6]) слое. Это обстоятельство является главным преимуществом метода дифференциальной УФ-спектроскопии по сравнению с другими спектроскопическими методами [1, 6—8].

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы показать возможности метода дифференциальной УФ-спектроскопии в определении энтальпии и энтропии гидратации оснований нуклеотидов.

Материалы и методы. Объектом исследования служили динатриевые соли рибонуклеозид-5'-фосфатов: цитидина (CMP), гуанозина (GMP) («Serva», ФРГ), уридина (UMP), инозина (IMP), аденозина (AMP) («Reanal», ВНР), а также гуанозин (Guo) («Chemapol», Чехословакия). Все препараты растворяли в деионизованном дистилляте, в который добавляли NaOH (для достижения pH 7,0) и NaCl. Общая концентрация ионов Na^+ в растворе составляла 10^{-3} М. Концентрацию нуклеотидов и гуанозина (B), равную $(7,2 \div 10) \cdot 10^{-5}$ М, определяли по величине коэффициента молярной экстинкции в максимуме спектра поглощения (табл. 1).

Таблица 1

Положение максимумов ($\nu_{\text{max}} \cdot 10^{-3}, \text{cm}^{-1}$) и соответствующие им коэффициенты молярной экстинкции ($\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^{-2}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) для наиболее интенсивных полос в спектре УФ-поглощения водных растворов нуклеотидов, относящихся к π -электронным переходам (10^{-3} М Na^+ ; pH 7,0; 20°C)
Maxima positions ($\nu_{\text{max}} \cdot 10^{-3}, \text{cm}^{-1}$) and corresponding molar extinction coefficients ($\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^{-2}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) for the most intensive bands in UV absorption spectra of nucleotide aqueous solutions, assigned to π -electron transitions (10^{-3} М Na^+ , pH 7.0, 20°C)

Нуклеотид	I ($\pi \rightarrow \pi^*$)		II ($\pi \rightarrow \pi^*$)	
	ν_{max}	ϵ_{max}	ν_{max}	ϵ_{max}
CMP	$36,7 \pm 0,2$	91 [9]	$43,6 \pm 0,5^{**}$	81
UMP	$38,1 \pm 0,2$	100 [9]	$49 \pm 0,2$	100
AMP	$38,3 \pm 0,3$	153 [9]	$48,3 \pm 0,2$	213
IMP	$40,1 \pm 0,2$	123 [9]	$49,4 \pm 0,2$	150
GMP, Guo	$37 \pm 0,6^{**}$	97,7	$39,5 \pm 0,2$	137 [9]

Примечание. Максимальная ошибка определения величины ϵ составляет $\pm 1\%$.

** Регистрируется на спектре в виде плеча.

Дифференциальные ультрафиолетовые спектры (ДУФС), индуцированные нагреванием (ΔA_{λ}), измеряли на спектрофотометре «Specord UVVIS» фирмы «Carl Zeiss Jena» (ГДР) по двухкюветной схеме: кюветы с идентичными растворами нуклеотидов помещали в оба канала спектрофотометра. В эталонной кювете поддерживали температуру 20°C, в рабочей — повышали ступенчатым нагревом со скоростью $0,3 \pm 0,1$ град/мин с шагом 10°C. Растворы выдерживали в течение 20 мин при каждой температуре для установления теплового равновесия между кюветой и термостатирующим блоком. Точность термостатирования кювет при всех температурах составляла $\pm 0,02$ °C. Градиент

в кюветах не превышал $0,1^{\circ}\text{C}$ [10]. В экспериментальные спектры ΔA_h вводили поправку на тепловое расширение раствора в рабочей кювете, используя данные о температурной зависимости коэффициента теплового расширения воды [11]. Дифференциальные спектры нормировали на концентрацию нуклеотидов: $\Delta \epsilon_h = \Delta A_h / B$.

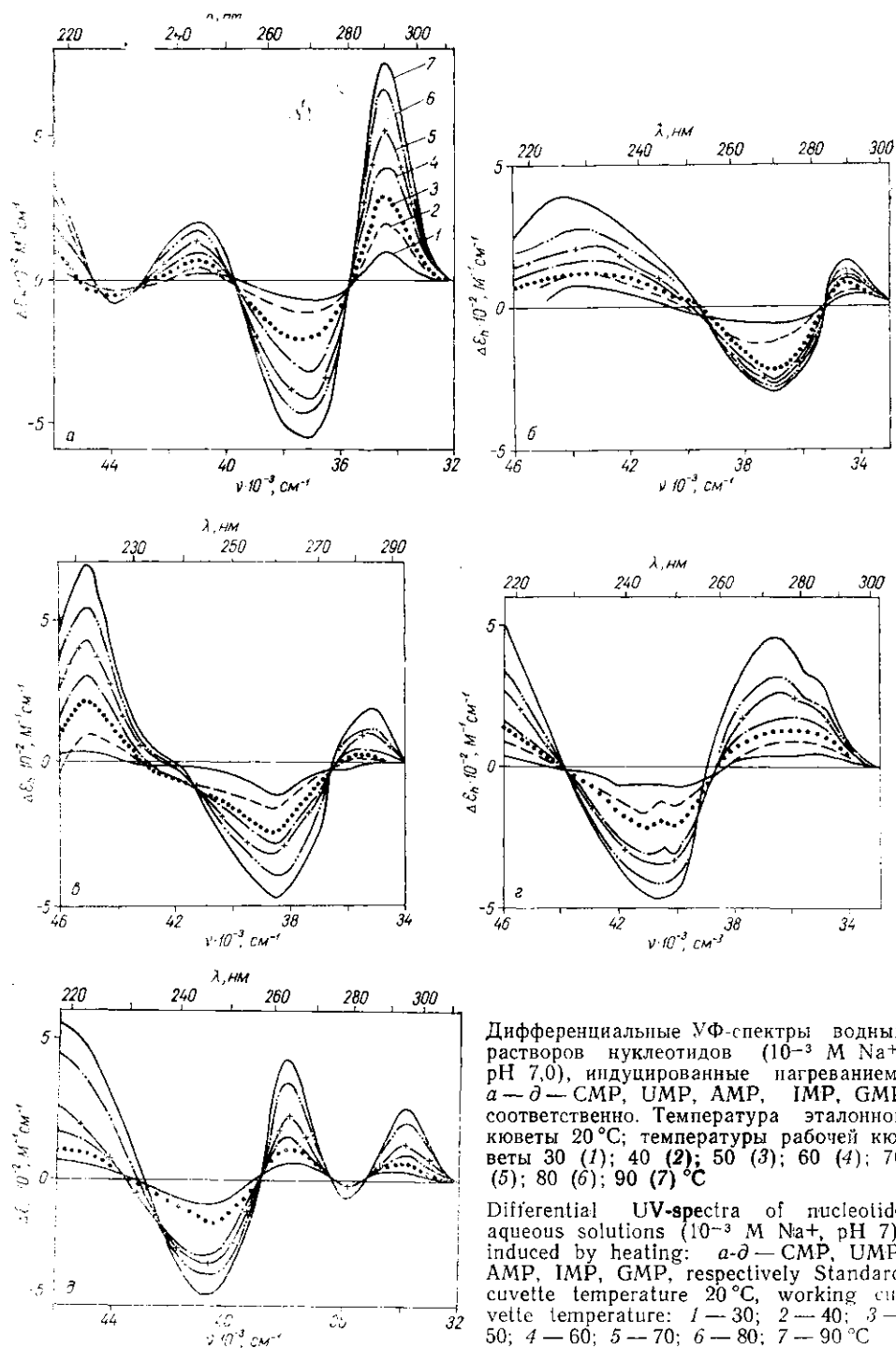
Результаты и обсуждение. При нагревании нуклеотидов их спектр поглощения изменяется (рисунок). В случае СМР, АМР, ИМР и УМР происходит красный сдвиг основной полосы поглощения (полоса I, табл. 1), приводящий к появлению самых длинноволновых экстремумов на ДУФС (рисунок). В случае ГМР (рисунок, д) сдвиг основной полосы (полоса II, табл. 1) индуцирует появление промежуточных экстремумов, расположенных при $\nu_{\text{max}} = 38\,000$ и $\nu_{\text{min}} = 41\,700$ cm^{-1} , тогда как самые длинноволновые — обусловлены красным смещением менее интенсивной полосы I (табл. 1). Для СМР два экстремума в области $\nu = (40-44) \cdot 10^3$ cm^{-1} индуцированы батохромным сдвигом полосы II (табл. 1). Наконец, самые коротковолновые максимумы на ДУФС АМР и УМР и возрастание поглощения в этой области волновых чисел для остальных нуклеотидов обусловлены красным сдвигом интенсивных полос поглощения, расположенных в диапазоне $(48-51) \cdot 10^3$ cm^{-1} : для УМР, АМР и ИМР — полосы II (табл. 1), для СМР, ГМР и Гуо — полосы I, расположенной при $\nu_{\text{max}} = (50,6 \pm 0,2) \cdot 10^3$ cm^{-1} (при одинаковом значении ν_{max} для СМР $\epsilon_{\text{max}} = 22\,800$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; для ГМР и Гуо $\epsilon_{\text{max}} = 21\,100$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Появление плечей на спектрах $\Delta \epsilon_h$ в случае ИМР ($\nu_{\text{max}} \sim 35\,000$ cm^{-1}) и АМР ($\nu_{\text{max}} \sim 42\,500$ cm^{-1}) (рисунок, в, г) является результатом сдвига не регистрируемых на УФ-спектрах малоинтенсивных полос поглощения, расположенных соответственно при $\nu_{\text{max}} = (37,4 \pm 1) \cdot 10^3$ и $(42-43) \cdot 10^3$ cm^{-1} [12].

При нагревании раствора гуанозина спектральные изменения подобны наблюдаемым в случае ГМР. Отличие заключается в том, что самые длинноволновые экстремумы на спектрах $\Delta \epsilon_h$ гуанозина смещены по сравнению с ДУФС ГМР в красную сторону на 500 cm^{-1} . Это обстоятельство, как и несколько большая интенсивность промежуточных экстремумов, свидетельствует о большем сдвиге полос I и II в случае нуклеозидов. В целом же форма и интенсивность всех измеренных дифференциальных спектров согласуются с данными, полученными для оснований, нуклеозидов и нуклеотидов в других ионных условиях [2, 4].

Возможными причинами изменения спектров поглощения мономеров в растворах при нагревании, в принципе, могут быть изменение равновесия ассоциации — диссоциация, таутомерные переходы, уменьшение констант ионизации гетероатомов оснований (pK_a) и, наконец, изменение взаимодействия с молекулами растворителя. Анализ этих причин, выполненный в работе [2], показал, что в разбавленных ($B < 10^{-2}$ M [13]) водных растворах при нейтральных значениях pH влияние ассоциации, таутомеризации и уменьшения pK_a незначительно, и основной вклад в изменение спектров поглощения вносит дегидратация. Этот вывод был подтвержден при анализе формы дифференциальных спектров, индуцируемых изменением состава растворителя [2].

Поскольку наблюдаемые на рисунке спектральные изменения обусловлены дегидратацией [2, 4], можно сделать вывод о том, что гидратация нуклеотидов и гуанозина приводит к коротковолновому сдвигу всех (как интенсивных, так и малоинтенсивных) полос поглощения. Это означает увеличение энергии всех синглетных электронных переходов, что соответствует уменьшению дипольных моментов возбужденного состояния оснований.

Полученные температурные зависимости ДУФС (рисунок) позволяют рассчитать энтальпию (ΔH) и энтропию (ΔS) гидратации по формуле (1), полученной в модели двух состояний (одно состояние соответствует полностью гидратированному основанию, другое — полностью



дегидратированному) [3].

$$\begin{aligned}
 (\Delta\epsilon_{hp})_{T,v} &= (\Delta\epsilon_h)_{T,v} + [(\Delta\epsilon_h)_{T,v} - (\Delta\epsilon_h)_{T,v}^*](1) + \gamma b_{T,v}^* \times \\
 &\times (b_{T,v} - b_{T,v}^*) / (1 + \gamma b_{T,v}^*) (b_{T,v} - b_{T,v}^*); \quad (1) \\
 \gamma &= e^{\Delta S/R}; \quad b_{T,v} = (e^{-\Delta H/RT})_v; \quad b_{T,v}^* = (e^{-\Delta H/RT})_v^*; \quad i = 1; 2.
 \end{aligned}$$

Здесь $\Delta\epsilon_h$ и $\Delta\epsilon_{hp}$ — соответственно экспериментальные и расчетные значе-

ния интенсивности ДУФС при различных волновых числах (ν) и температурах (T). $T_1 = 313$ К, $T_2 = 353$ К — температуры, при которых полагают, что $\Delta\epsilon_{hp} = \Delta\epsilon_h$.

Выражение (1) основано на предположении о линейном вкладе в спектры поглощения гидратированных и дегидратированных оснований, относительное количество которых при заданной температуре определяется термодинамическим равновесием в двухуровневой системе. Такая модель тем точнее, чем меньше молекул воды определяет изменение спектров поглощения, поскольку число промежуточных состояний при этом должно также уменьшаться. Согласно экспериментальным данным [1, 7, 8] и теоретическим расчетам [14], число молекул воды (n), связанных атомами кольца оснований, действительно невелико: в зависимости от их природы $n = 2 \div 5$ (табл. 2).

Таблица 2

Термодинамические параметры гидратации оснований нуклеотидов, полученные методом дифференциальной УФ-спектроскопии, в рамках двухуровневой термодинамической модели (10^{-3} М Na⁺, pH 7,0, 20 °С)

Thermodynamic parameters for hydration of nucleotide bases, obtained by DUVS in the frame of the two-leveled thermodynamic model (10^{-3} M Na⁺; pH 7.0; 20 °C)

Параметры	UMP	AMP	IMP	GMP	Guo	CMP
ΔH , ккал/моль	-2,5	-3,4	-3,8	-6,2	-6,0	-6,3
$T\Delta S$, ккал/моль	14,9	14,2	14,2	11,9	13,2	-4,8
ΔG , ккал/моль	-17,4	-17,6	-18,0	-18,1	-19,2	-1,5
μ , D [15]	4,6	2,9	—	7,5	7,5	7,6
n	1 [1]	4 ÷ 5 [7]	—	4 [1]	—	2 ÷ 3 [1, 8]
$\Delta H/n$, ккал/моль	-2,5	-(0,9 ÷ 0,7)	—	-1,6	—	-(3,2 ÷ 2,1)

Величины ΔH и ΔS определяли минимизацией квадратичного отклонения (χ) модифицированным методом Пауэлла [16]:

$$\chi^2 = \sum_{T, \nu} [(\Delta\epsilon_{hp})_{T, \nu} - (\Delta\epsilon_h)_{T, \nu}]^2. \quad (2)$$

Точность вычисления минимума определяется по изменению двумерного вектора $\vec{x}(\Delta H, \Delta S)$. Вычисление заканчивалось, если

$$\text{NORMA } |\vec{x}(k+1) - \vec{x}(k)| < a \cdot \text{NORMA } [\vec{x}(k) + E], \quad (3)$$

где k — номер итерации, $E = 10^{-12}$ — точность, задаваемая в процессе вычисления, $a = 2^{-21}$ [17].

Расчеты проведены на ЭВМ ЕС-1045 в диалоговом режиме с использованием диалоговой системы ДИСО [17]. Для уменьшения влияния случайных экспериментальных ошибок минимизацию проводили по нескольким (трем—пяти) волновым числам. При этом наибольшие отклонения значений ΔH и ΔS , приведенных в табл. 2, от полученных при минимизации по отдельным волновым числам и их различным комбинациям (они определяют максимальную экспериментальную ошибку) составили ± 10 и $\pm 12,5$ % для ΔH и ΔS соответственно.

Как видно из табл. 2, энтальпия гидратации оснований CMP, GMP и Guo одинакова и в 1,6 ÷ 2,5 раза больше, чем для остальных нуклеотидов. Поскольку возмущающее спектр поглощения взаимодействие молекул воды с кольцами оснований определяется главным образом диполь-дипольным взаимодействием [18], то причина этих различий ΔH должна определяться соответствующим отличием величин дипольного момента оснований. Действительно, наблюдается удовлетворительная корреляция между изменением экспериментальных значений ΔH и рассчитанных теоретически величин суммарного дипольного момента основного состояния оснований (μ): значения μ для гуанина и цитозина также одинаковы и соответственно в 1,6 ÷ 2,6 раза больше, чем для

аденина и урацила (табл. 2). Этот результат показывает, что найденные величины ΔH характеризуют взаимодействие только тех молекул воды, которые находятся в непосредственной близости к гетероатомам оснований. Другие молекулы гидратной оболочки, связанные с фосфатами и рибозой, а также находящиеся в ее внешних слоях, практически не способны влиять на электронные переходы нуклеотидов. Равенство значений ΔH для GMP и Guo подтверждает этот вывод. Нормирование полученных величин ΔH на число молекул, гидратирующих основания нуклеотидов (n), дает удельные значения $\Delta H/n$ ($0,7 \div 3,2$ ккал/моль, табл. 2), близкие к величинам, характеризующим гидратный слой ДНК ($1,2 \div 2,3$ ккал/моль) [6]. Хотя эти молекулы воды связаны с основаниями нуклеотидов наиболее сильно [6, 19], абсолютные значения ΔH невелики и сравнимы с величиной энтальпии связывания ионов переходных металлов. Так, например, для комплекса ионов Cu^{2+} с N3 поли(С) $\Delta H = -3,5$ ккал/моль [20], а с N7 метилпурина — $\Delta H = -4,5$ ккал/моль [21]. Таким образом, в водных растворах ионы металлов и молекул воды являются конкурентами за связывание активных центров на основаниях нуклеиновых кислот. Меньшая величина модуля энтальпии гидратации, возможно, является причиной, по которой при образовании комплексов ионы переходных металлов связываются с гетероатомами колец непосредственно [13].

Для большинства изученных веществ гидратация увеличивает энтропию нуклеотида ($\Delta S > 0$), причем энтропийный член вносит основной вклад в изменение свободной энергии Гиббса ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), которое для UMP, AMP, IMP, GMP и Guo практически одинаково (табл. 2).

Неожиданными оказались энтропийные характеристики CMP, для которого $\Delta S < 0$. Последнее, как и близость модулей энтальпийного и энтропийного членов, приводит к аномально малой для этого нуклеотида абсолютной величине ΔG (табл. 2).

Цитидин характеризуется самой большой величиной константы ионизации гетероатомов оснований ($pK_a = 4,22$ [2]), поэтому можно было предположить, что причиной этой особенности является частичная его ионизация при повышении температуры. Однако максимальное отличие температурных зависимостей $\Delta \epsilon_h$, полученных при использовании фосфатного буфера (рН 7,0), от приведенных на рисунке, а составило $\pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, что находится в пределах ошибки измерения изменения поглощения спектрофотометром ($\pm 25 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Таким образом, причина аномального знака энтропийного члена для CMP не ясна. Тем не менее можно отметить, что среди всех оснований цитозин обладает самым низким значением дипольного момента синглетного возбужденного состояния. Его величина ($\mu^* = 0,884 D$) в $2 \div 5$ раз меньше, чем для других канонических оснований [22]. Поскольку время нахождения оснований в возбужденном состоянии ($10^{-12} - 10^{-13}$ с [23]) сравнимо с таковым для молекулярных колебаний и перестроек в гидратной оболочке ($10^{-13} - 10^{-12}$ с [24]), то возбужденное состояние также может, в принципе, влиять на параметры гидратации оснований. Этим, возможно, объясняется аномалия поведения энтропии CMP.

С другой стороны, имеет место корреляция полученных нами данных с результатами недавно опубликованной работы Букина [25], который обнаружил, что модуль молярной адиабатической сжимаемости (β_s) гидратной оболочки цитозина в $1,5 \div 4,5$ раза больше, чем у других канонических оснований. Поскольку величина β_s определяется структурным состоянием связанных молекул воды [25], то ее аномалия должна коррелировать с поведением именно энтропийного члена свободной энергии гидратации.

Таким образом, применение метода дифференциальной УФ-спектроскопии позволило определить термодинамические параметры гидратации компонентов нуклеиновых кислот, характеризующие гидратный слой, находящийся в непосредственной близости от гетероатомов оснований.

В заключение авторы выражают благодарность М. А. Семенову и А. Б. Теплицкому за обсуждение результатов работы и полезные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стариков Е. Б., Больбух Т. В., Семенов М. А. Изучение изотерм гидратации нуклеиновых кислот.— Харьков, 1987.—19 с. (Препринт/АН УССР. ИРЭ, № 359).
2. Frechet D., Ehrlich R., Remy P. Thermal perturbation differential spectra of ribonucleic acids. 1. Hydration effects // Nucl. Acids Res.—1979.—7, N 7.— P. 1965—1980.
3. Thermal perturbation differential spectra of ribonucleic acids. 2. Nearest neighbour interactions / D. Frechet, R. Ehrlich, P. Remy, J. Gabarro-Agpa // Ibid.— P. 1981—2001.
4. Маевский А. А. О температурной зависимости электронных спектров поглощения полинуклеотидов и их компонентов // Биофизика.—1975.—20, № 6.— С. 957—960.
5. Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот / А. В. Бородавкин, Э. И. Будовский, Ю. В. Морозов и др. // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1977.—227 с. (Сер. Молекуляр. биология; Т. 14).
6. Семенов М. А., Малеев В. Я. Энергетика гидратации ДНК // Биофизика.—1986.—31, № 5.— С. 764—767.
7. Исследование гидратации компонентов нуклеиновых кислот методами ИК-спектроскопии и сверхвысокочастотной диэлектротометрии / М. А. Семенов, В. А. Кашпур, Т. В. Больбух, В. Я. Малеев // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 1.— С. 18—22.
8. Стариков Е. Б., Семенов М. А. ИК-спектроскопическое и квантовомеханическое изучение гидратации динатриевой соли цитидин-5'-монофосфата // Журн. физ. химии.—1988.—42, № 8.— С. 2120—2126.
9. Калинин Ф. Л., Лобов В. П., Жидков В. А. Справочник по биохимии.— Киев: Наук. думка, 1971.—1013 с.
10. Исследование действия ионов двухвалентной меди на тепловую денатурацию ДНК / Ю. П. Благой, В. А. Сорокин, В. А. Валеев, Г. О. Гладченко // Молекуляр. биология.—1978.—12, № 4.— С. 795—805.
11. Чайлдс У. Физические постоянные / Под ред. В. И. Рядника.— М.: Госиздат физ.-мат. лит., 1962.—40 с.
12. Обнаружение слабых электронных взаимодействий при изучении переходов спираль— клубок в гомополинуклеотидах / В. А. Сорокин, И. В. Левченко, В. А. Валеев, Ю. П. Благой // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 1.— С. 151—158.
13. Мартин Р. Б., Мариам Я. Х. Взаимодействие между ионами металлов и нуклеиновыми основаниями, нуклеозидами и нуклеотидами в растворах // Ионы металлов в биол. системах. Амбивалент. свойства нуклеотидов.— М.: Мир, 1982.— С. 53—103.
14. Pullman B., Miertus S., Perahia L. Hydration scheme of the purine and pyrimidine bases and base-pairs of the nucleic acids // Theor. chim. acta.—1979.—50, N 4.— P. 317—325.
15. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1987.—584 с.
16. Химмельблау Д. Прикладное нелинейное программирование.— М.: Мир, 1975.—534 с.
17. Диалоговая система оптимизации для ЕС ЭВМ / В. И. Белан, К. К. Маслов, А. А. Моторная, В. И. Хатунцев // Пакеты прикл. программ. Програм. обеспечение оптимизационных задач.— М.: Наука, 1987.— С. 108—115.
18. Jaffe H. H., Orchin M. Theory and applications of ultraviolet spectroscopy.— New York; London: J. Wiley and Sons, 1962.— P. 186—196.
19. Quantitative study of ordered water structure around a B-DNA dodecamer / M. L. Корка, А. V. Featini, N. Drew, R. E. Dickerson // J. Mol. Biol.—1983.—163, N 1.— P. 129—146.
20. Spectroscopic studies of bivalent metal ion binding to single-stranded poly C / V. A. Sorokin, Yu. P. Blagoi, V. A. Valeev et al. // Stud. biophys.—1986.—114, N 1—3.— P. 269—276.
21. Arpalahti J., Lönnberg H. Complexing of 3d-transition metal ions with 9-substituted purines. 2. Stoichiometry and thermodynamics of the complex formation // Inorg. chim. acta.—1983.—80, N 1.— P. 25—31.
22. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1976.—314 с.
23. Никогосян Д. Н., Легохов В. С. Нелинейная лазерная фотофизика, фотохимия и фотобиология нуклеиновых кислот.— Троицк: Изд-во Троицк. ин-та спектроскопии, 1984.—355 с.
24. Наберухин Ю. И. Проблема построения количественной модели строения воды // Журн. структур. химии.—1984.—25, № 2.— С. 60—67.
25. Букин В. А. Акустическое исследование гидратации нуклеиновых оснований в водных растворах. Анализ аномалий воды в гидратной оболочке // Биофизика.—1988.—33, № 6.— С. 926—931.

Физ.-тех. ин-т низких температур АН УССР, Харьков

Получено 03.02.89

STUDIES IN HYDRATION ENERGETICS OF NUCLEIC ACID COMPONENTS
BY THE DIFFERENTIAL UV-SPECTROSCOPIC METHOD

V. A. Sorokin, V. L. Galkin, V. A. Valeev, E. S. Arkhipova,
G. O. Gladchenko, Yu. P. Blagoi

Institute for Low Temperature Physics and Engineering,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

Summary

Differential UV spectra of CMP, UMP, AMP, IMP, GMP and Guo are obtained, which are due to dehydration of these substances during heating of their aqueous solutions from 20 to 90°C. The enthalpies and entropies of hydration characterizing the interaction between water molecules and heteroatoms of the base rings are calculated. The entropy term greatly contributed to the variations of the free Gibbs energy for UMP, IMP, AMP, GMP and Guo. The enthalpy and entropy terms are comparable for CMP.

УДК 577.112.5

Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, Н. В. Роднин, М. Т. Кириленко,
О. С. Мирошниченко, С. А. Атепалихина, Л. В. Гудкова, Э. А. Козлов

БРОМЦИАНОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ
КАТАЛАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*

*Каталазу *P. vitale* расщепляли бромцианом. Гель-фильтрованием через сефадексы, ионообменной хроматографией на различных ионообменниках, экстракцией бутанолом и водным буфером, высоковольтным электрофорезом на бумаге выделены девять фрагментов, насчитывающих в сумме 387 аминокислотных остатков (50 % полипептидной цепи белка). Исследовали N-концевые аминокислотные последовательности, триптические и химотриптические пептиды этих фрагментов. В результате установлена полная аминокислотная последовательность фрагмента, включающего 61 остаток аминокислот, и частичная аминокислотная последовательность двух фрагментов, насчитывающих в сумме 37 остатков.*

Настоящее сообщение является продолжением серии публикаций, посвященных исследованию первичной структуры каталазы *P. vitale*. Первые три работы [1—3] освещают результаты изучения триптических пептидов.

Материалы и методы. Расщепление белка бромцианом осуществляли по методу Гросса и Виткопа [4]. 800 мг (~10 мкМ) каталазы и 100 мг триптофана растворяли в 50 мл 70 %-ной HCOOH. Добавляли бромциан (500 мг в 2 мл HCOOH), выдерживали 22 ч при комнатной температуре в темноте и лиофилизировали.

Обессоливание проводили на колонке (3×90 см) с сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция), уравновешенным аммиачной водой.

Гель-фильтрование через сефадекс G-75 (грубый) («Pharmacia»). Растворители: а) 0,2 М трис-HCl-буфер, pH 8,7, содержащий 6 М Gu-HCl; б) 20 %-ная HCOOH. Полученные фракции обессоливали.

Ионообменная хроматография. ДЭАЭ-сефадекс A-25 («Pharmacia»). Исходный буфер: 0,025 М трис-HCl, pH 7,4, содержащий 6 М мочевины. Линейный градиент: 150 мл исходного буфера и 150 мл этого же буфера с добавкой 0,4 М KCl. Сульфопропил (SP)-сефадекс C-50 («Pharmacia»). Исходный буфер: универсальная буферная смесь, pH 3,7 [5], содержащая 6 М мочевины. Вогнутый градиент: 75 мл универсальной буферной смеси, содержащей 6 М мочевины, и 75 мл этой же смеси с добавкой 0,5 М KCl. Фракции, полученные ионообменной хроматографией, обессоливали.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЖХ). Применяли систему FPLC («Pharmacia»). Колонка моноQ. Исходный буфер: 0,02 М трис-HCl, pH 7,4, содержащий 6 М мочевины. Градиент создавали исходным буфером, содержащим 1 М KCl. Полученные фракции обессоливали.

Экстракция бутанолом. Материал фракции растворяли в 50 мл 20 %-ной