

ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРОВ ИНФРАКРАСНОГО ПОГЛОЩЕНИЯ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ФИТОВИРУСОВ СПИРАЛЬНОГО И КУБИЧЕСКОГО ТИПОВ СИММЕТРИИ

В интервале 400—4000 см⁻¹ с высоким разрешением изучены общие закономерности и различия спектров инфракрасного поглощения модельных вирусов растений спиральной (вирус табачной мозаики) и кубической (вирус крапчатости гвоздики) симметрии.

Установлено, что, несмотря на общность биохимических свойств исследованных фитовирусов и общие закономерности генезиса их колебательных спектров, существуют особенности спектральных характеристик, позволяющие дифференцировать названные вирусы по спектрам инфракрасного поглощения.

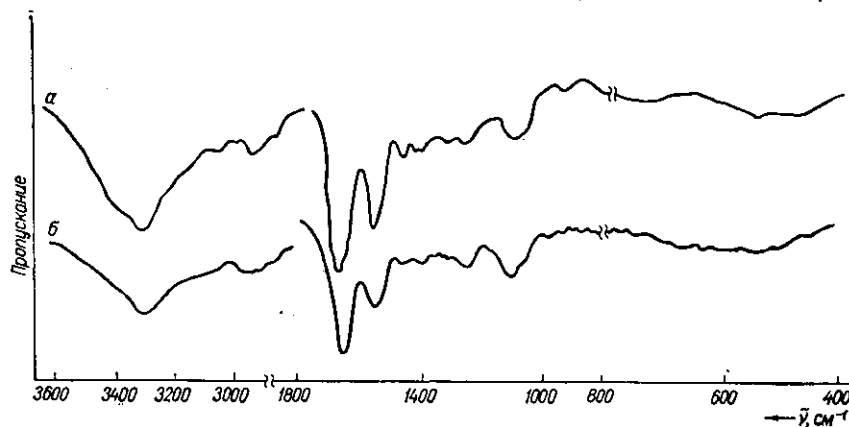
Введение. Вирусы интенсивно используются в качестве моделей для множества молекулярно-биологических экспериментов и теоретических построений благодаря относительной простоте биохимического состава, подчинению формы законам строгой пространственной симметрии, яркой выраженности биологических функций в тесной связи их со структурой. Тем не менее, несмотря на сравнительно несложное строение, даже самые простые вирусы состоят из нескольких сот тысяч атомов, объединенных в тысячи физически неэквивалентных атом-атомных связей [1—4], и поэтому с позиций качественного и количественного спектрального анализа представляют собой чрезвычайно сложные атомно-молекулярные системы, не поддающиеся строгому рассмотрению. Вместе с тем интенсивное развитие и высокая практическая значимость физико-химической биологии, обусловленные во многом активным проникновением физических, в том числе спектроскопических подходов и методов, ставят проблему измерений, интерпретации и прогнозирования спектральных свойств биологических систем различных уровней организации, включая вирусные нуклеопротеиды [5—8]. Целью данной работы были экспериментальные исследования и феноменологическая интерпретация колебательных (инфракрасных) спектров вирусов растений, являющихся типичными представителями наиболее распространенных в мире вирусов типов симметрии — ротационно-трансляционного и икосаэдрического.

Материалы и методы. В качестве объектов были выбраны детально изученные [1, 2] в биохимическом отношении вирусы растений — вирус табачной мозаики, штамм *Vulgare* (ВТМ) [1, 2] и вирус крапчатости гвоздики (ВКГ) [3, 4]. Выбор этих вирусов обусловлен также и тем, что ВТМ и ВКГ, относясь к разным типам пространственной симметрии — спиралевидному и икосаэдрическому соответственно, — вместе с тем содержат один и тот же биохимический и пространственный тип нуклеиновой кислоты — одноцепочечную РНК с близким процентным нуклеотидным составом [2]. Накопление, выделение и очистка вирусов осуществлялись по методикам [3, 4] с использованием дифференциального центрифугирования, центрифугирования в градиентах плотности и диализа против бидистиллята Н₂О. Чистоту препаратов контролировали с помощью УФ-спектрфотометрии и электронной микроскопии.

Очищенную концентрированную суспензию вирусов в Н₂О наносили в виде капли на поверхность материалов, прозрачных в инфракрасной (ИК) области спектра (KRS-5, высокоомный кремний или германий), после чего ее высушивали под вакуумом или в термостате при 30 °С в течение 4—12 ч. Условия высушивания были равными для ВТМ и ВКГ. Исследования колебательных спектров в области 400—4000 см⁻¹ проводили на спектрометрах UR-20 («Karl Zeiss Jena», ГДР) и ИКС-24 (ЛОМО, СССР) в условиях, позволяющих регистрировать волновое

число (частоту) полос с точностью $\pm 2 \text{ см}^{-1}$, величины расщеплений и наблюдаемую полуширину — $\pm 1 \text{ см}^{-1}$; погрешность в определении относительной интенсивности пропускания составляла $\pm 3 \%$.

Результаты и обсуждение. Типичные спектрограммы исследованных вирусов приведены на рисунке (спектры инфракрасного поглощения высушенных пленок РНК-содержащих вирусов: *a* — вирус табачной мозаики; *b* — вирус крапчатости гвоздики), в таблице содержатся



результаты их обработки — параметры основных наблюдавшихся полос, усредненные по пяти измерениям трех различных пар образцов. Анализ полученных экспериментальных данных позволяет сформулировать следующие заключения.

1. Спектры ИК поглощения изученных вирусов представляют собой набор множества (свыше 70 с учетом расщеплений) полос различной интенсивности и полуширины. Полосы расположены группами в интервалах 400—1750 и 2600—3600 см^{-1} . Между 1750 и 2800 см^{-1} достаточно интенсивные полосы с четкими максимумами не регистрируются. Общий вид спектров обоих вирусов существенно различается в интервалах 400—800, 800—1750 и 2800—3600 см^{-1} . Так, для ИК поглощения в интервале 400—800 см^{-1} характерно наличие широкой непрерывной полосы средней интенсивности, простирающейся от 450 до 750 см^{-1} и являющейся, по-видимому, суперпозицией полос деформационных колебаний O—H-связей кристаллизационной воды, гидроксил-содержащих аминокислот белка и нуклеотидов, O=C—N плоских, N—H и C—O неплоских колебаний скелетной, пептидной связи белка, а также деформационных плоских и неплоских колебаний атомных P—O-, C—O-, N—H-групп сахара, фосфата и оснований нуклеиновых кислот. Перекрывание большого числа колебаний химически различных и химически одинаковых, но пространственно неэквивалентных групп, находящихся в различном силовом окружении, приводит к тому, что поглощение в этом интервале носит характер квазиконтинуума, на фоне которого проявляется около 10 максимумов низкой пиковой интенсивности.

В интервале 800—1750 см^{-1} наблюдаются, в основном, хорошо различающиеся, хотя и обладающие сложной структурой, полосы средней и высокой интенсивности. Здесь имеет место подъем общего фона (базовой линии) при переходе от 1300 к 1550—1660 см^{-1} , где расположена сильная полоса кристаллизационной воды.

Специфичность спектров ИК-поглощения ВТМ и ВКГ в высокочастотном интервале проявлялась в том, что на фоне плавного увеличения поглощения, начиная с 2450 см^{-1} наблюдается совокупность полос, четыре из которых образуют характерную группу в интервале 2850—2970 см^{-1} , обусловленную симметричными и антисимметричными колебаниями C—H-связей метиленовой и метильной групп. Наконец, особенностью поглощения в этой области является наличие сильного

Параметры полос спектров ИК-поглощения рибонуклеопротеидов ВТМ и ВКГ

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|--------------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------|----------------|-----------------------------|---|
| ν , см^{-1} | I , отн. ед. | δ , см^{-1} | ν , см^{-1} | I , отн. ед. | δ , см^{-1} | |
| 427 | 17,5 | 12,0 | 425 | 13,0 | 14,0 | Скелетные неплоские деформационные колебания пептидной связи: N—H, C=O неплоские изгибающие колебания (амид 4, 5, 6); N—H неплоские деформационные колебания оснований РНК (фосфат 6) |
| 455 | 30,5 | 16,0 | 460 | 8,0 | 12,0 | |
| 480 | 32,5 | 24,0 | 505 | 16,0 | — | |
| 525 | 75,0 | 70,0 | 552 | 32,0 | 100 | |
| 645 | 84,5 | 100 | 627 | 53,0 | — | Дибрационные колебания кристаллизационной H ₂ O |
| 700 | 70,0 | 6,0 | 700 | 30,0 | 100 | |
| 750 | 42,5 | 11,5 | 760 | — | — | C—H неплоские качания в белке (амид 5); O—P—O симметричные валентные колебания РНК (фосфат 5) O—P—O асимметричные валентные колебания (фосфат 4); C—C—O симметричные валентные колебания рибозы; рибозо-фосфатные и скелетно-депочечные колебания (C—C, O—CH, P—O—P, P—OH, C—O, P—O—C валентные) |
| 785* | 25,0 | 6,0 | 780* | 1,0 | — | |
| 800 | 10,0 | 10 | 798 | 1,0 | — | |
| 820* | 7,5 | 10 | 820* | 1,0 | — | |
| 870* | 7,0 | 20,0 | 870* | 12,0 | 23,0 | |
| 885 | 5,0 | 16,0 | 880 | — | — | |
| 920* | 5 | 10 | 920* | 12,0 | 12,0 | |
| 945 | 22,5 | 16,0 | — | — | — | |
| 962* | 20,0 | 26,0 | 972* | 14,0 | 16,0 | |
| 1000 | 18,0 | 20,0 | 998 | 12,0 | 15,0 | |
| 1086* | 90,0 | 90 | 1088* | 100,0 | ~100 | |
| 1105* | 100,0 | 85 ^{86,0} | 1122 | 85,0 | ~90 | |
| 1225* | 50 | 26,0 | 1220* | — | — | |
| 1242* | 80,0 | 56,0 | 1242* | 40,0 | 51,0 | |
| 1270 | 60,0 | 25,0 | 1265 | — | — | O—P—O асимметричные валентные колебания (фосфат 1) |
| 1320 | 65,0 | 45,0 | 1340* | 11,0 | 40,0 | |
| 1408* | 55,0 | 35,0 | 1402* | 45,0 | 28,0 | Смешанные колебания оснований РНК; валентные C—CO ₂ колебания РНК N—H деформационные колебания (амид 3) |
| 1420 | 30,0 | 15,0 | 1420 | — | — | |
| 1450* | 50,0 | 36,0 | 1440* | 14,0 | 18,0 | Смешанные колебания оснований РНК; CO ₂ валентные симметричные колебания; CH ₂ , CH ₃ асимметричные деформационные колебания белка |
| 1550* | 145,0 | 65,0 | 1538* | 92,0 | 67,0 | |
| 1667* | 225,0 | 85,0 | 1640* | 190,0 | 76,0 | N—H деформационные плоские колебания; C—N валентные колебания белка (амид 2) |
| 1730 | 45,0 | 12,0 | 1715 | 20,0 | 15,0 | |
| 2800 | — | — | 2800 | 18,0 | 50,0 | C—N валентные колебания оснований РНК и N—H деформационные колебания белка C=O валентные колебания оснований РНК C—H, CH ₂ , CH ₃ , N—H, N—H ₂ , N—H ₃ ⁺ валентные симметричные и антисимметричные колебания белка, а также рибозы и оснований РНК |
| 2840 | — | — | — | — | — | |
| 2855 | 25,0 | 20,0 | 2855 | 22,0 | 30,0 | |
| 2875 | 45,0 | 20,0 | 2880 | 26,0 | 30,0 | |
| 2935 | 80,0 | 25,0 | 2935 | 36,0 | 40,0 | |
| 2965 | 72,5 | 25,0 | 2965 | 25,0 | 40,0 | |
| 2975 | 80,0 | 20,0 | 2990 | — | — | |
| 3048 | 12,0 | 40,0 | 3050 | 10,0 | 50,0 | |
| 3070 | 15,0 | 40,0 | 3075 | 13,0 | 50,0 | |
| 3200 | 13,0 | — | 3195 | 12,0 | — | |
| 3300* | 220 | 400 | 3290* | 142,2 | 400 | |
| 3365 | — | — | 3350 | 124,0 | — | |
| 3390 | — | — | 3390 | 103,0 | — | |
| 3450 | — | — | 3450 | 53,0 | — | |

Примечание. ν — волновое число; I — относительная пиковая интенсивность; δ — полуширина за вычетом аппаратной функции прибора; звездочкой отмечены полосы со сложной структурой.

широкого максимума, завершающего плавный подъем поглощения со стороны средних частот и имеющего частоту вблизи 3300 см^{-1} , после чего происходит почти монотонное, на расстоянии 300 см^{-1} , спадание поглощения практически до нулевого уровня.

Таким образом, в целом спектры ИК-поглощения ВТМ и ВКГ имеют много общего и на качественном уровне у них нет значительных отличий.

В ИК-спектрах изученных фитовирусов, являющихся с биохимической точки зрения рибонуклеопротеидами, четко отражается их биомолекулярный состав. Так, в спектрах обоих объектов присутствуют полосы поглощения, типичные как для белков [5, 6] (например, амид 1, амид 2, амид 3, амид В), так и для рибонуклеиновых кислот [7, 8] (фосфат 1, фосфат 2 и др.).

2. При количественном анализе спектральных характеристик полос ИК-поглощения этих двух фитовирусов, принадлежащих к разным типам пространственной симметрии и содержащих разные абсолютные и относительные количества белка и РНК, обнаруживаются существенные различия.

Так, у них заметно различаются формы полос поглощения, образованных перекрывающимися по частоте группами колебаний в интервале $450\text{—}750\text{ см}^{-1}$. Наряду с этим имеют место несовпадения частот ряда максимумов (480 и 505 , 525 и 552 , 615 и 600 , 645 и 627 см^{-1} для ВТМ и ВКГ соответственно). Для совпадающих или близких по частоте максимумов (например, $455\text{—}460$, 700 , $780\text{—}782\text{ см}^{-1}$) наблюдаются значительные различия в относительной интенсивности.

Достоверно дифференцируются по форме и полуширине сложные мажорные полосы, отвечающие симметричным валентным колебаниям атомов O—P—O -группы в полимерной цепи нуклеиновых кислот и близких к ним по частоте валентным колебаниям P—O—C -группы, а также C—O валентным колебаниям рибозы. В частности, максимум поглощения для этой полосы ВТМ находится на 1105 см^{-1} , а для ВКГ — на 1090 см^{-1} , причем полуширины их также различны: 86 и 102 см^{-1} для ВТМ и ВКГ соответственно. В то же время спектральное расположение максимумов полос антисимметричного валентного P—O—P -колебания практически совпадает для обоих вирусных нуклеопротеидов, имея значение 1242 см^{-1} . Однако их относительные пиковые интенсивности отличаются при этом почти в два раза.

Весьма существенны различия в параметрах характеристических полос белков — амид 1, амид 2. Частоты центральных максимумов полос колебаний амид 1 равны 1665 и 1650 см^{-1} , а амид 2 — 1550 и 1538 см^{-1} для ВТМ и ВКГ соответственно. Как следует из таблицы, значительны и различия в их относительных интенсивностях.

В районе C—N валентных колебаний ($2850\text{—}2970\text{ см}^{-1}$) спектры очень похожи — здесь наблюдается характерная группа перекрывающихся полос с близкими для обоих вирусов частотами, но с достоверно различающимися интенсивностями и вследствие этого с разной формой поглощения в этом интервале.

Наконец, следует отметить различия в характеристиках полос, максимумы которых для обоих вирусов лежат вблизи 3300 см^{-1} — частоты, соответствующей колебанию амид А белка, обусловленному валентным растяжением N—H -связи пептидной группы. Несмотря на ее огромную и близкую для обоих объектов полуширину ($360\text{—}380\text{ см}^{-1}$), регистрируется достоверное различие в частотном положении максимума — 3300 и 3290 см^{-1} для ВТМ и ВКГ соответственно. Различаются также относительная интенсивность и форма высокочастотного крыла этой полосы у изученных вирусов.

Таким образом, спектры ИК-поглощения биохимически и пространственно простейших, автономно существующих биологических структур, каковыми являются исследованные в работе фитовирусы, имеют чрезвычайно сложный характер, и их детальная интерпретация в настоящее время представляет громоздкую, трудноразрешимую проблему.

Вместе с тем на основе знания спектров входящих в их состав молекул белка и рибонуклеиновой кислоты удается установить ряд закономерностей, общих для этих вирусов, различающихся деталями физико-химической структуры. Наряду с этим, несмотря на известную общность физико-химических свойств и биологических функций и общие закономерности генезиса колебательных спектров, для целого ряда полос, связанных с колебаниями атомов главных цепей и боковых радикалов белка и нуклеиновых кислот ВТМ и ВКГ, существуют особенности спектральных характеристик, позволяющие однозначно соотносить названные рибонуклеопротеиды по их ИК-спектрам [9, 10].

В заключение искренне благодарю О. И. Ильченко и С. А. Ромашева за помощь в подготовке образцов для исследований.

Резюме

Проведено порівняльні дослідження спектрів інфрачервоного поглинання (ІЧП) спіралевидного вірусу тютюнової мозаїки та ікосаедричного вірусу крапчатості гвоздики в спектральній області 400—4000 см⁻¹. Спектри вірусів представлені більш як 70 смугами, що мають значну півширину (від 10 до 400 см⁻¹) та складну тонку структуру. Параметри спектрів ІЧП корелюють з особливостями біохімічної будови макромолекул і нуклеопротеїдних комплексів. В той же час існують особливості спектральних характеристик, що дозволяють диференціювати названі віруси по спектрах ІЧП. Зокрема, виявляються помітні відмінності в інтенсивності, півширині і частотному положенні смуг, що відповідають білкам та рибонуклеїновим кислотам віріонів.

Summary

The comparative investigation of infrared absorption spectra of spiral tobacco mosaic virus and isosahedral carnation mottle virus was carried out in spectral range 400—4000 cm⁻¹. Viral spectra were represented by more than seventy bands with considerable half-width (10—400 cm⁻¹) and complicated fine structure.

The infrared absorption spectrum parameters correlate with macromolecule and nucleoprotein complex biochemical structure peculiarities. In the same time because of existing spectral characteristics peculiarities it is possible to differentiate assumed viruses after their infrared absorption spectra.

In particular noticeable differences in band intensity, half-width and frequency position corresponding to virion proteins and ribonucleic acids are found.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mathews R. E. F. Plant virology.—New York; London: Acad. press, 1970.—602 p.
2. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений.—М.: Мир, 1978.—429 с.
3. Ильченко О. И., Бойко А. Л. Выявление микроколичеств вируса крапчатости гвоздики с помощью иммунохимической тест-системы // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1984.—№ 2.—С. 68—70.
4. Tremaine J. H. Physical, chemical and serological studies on carnation mottle virus // Virology.—1970.—42, N 3.—P. 611—620.
5. Литвинов Г. С., Ильченко О. И., Бойко А. Л. Инфракрасная спектроскопия белка, нуклеиновой кислоты и нуклеопротеида вируса крапчатости гвоздики // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1986.—№ 3.—С. 63—65.
6. Litvinov G. S., Dovbeshko G. I., Strouk V. I. Infrared absorption peculiarities of the biological systems on different organization levels // Recent developments in molecular spectroscopy / Eds B. Jordanov et al.—Singapore etc.: World sci.—1989.—P. 674—686.
7. Parker F. S. Applications of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry.—New York; London: Plenum press, 1983.—550 p.
8. Сузи Г. Инфракрасные спектры биологических молекул и модельных соединений // Структура и стабильность биологических макромолекул.—М.: Мир, 1973.—С. 481—578.
9. Литвинов Г. С. Спектры инфракрасного поглощения икосаэдрического и спиралевидного РНК-содержащих фитовирусов и их молекулярных компонентов // VI конф. по спектроскопии биополимеров: Тез. докл.—Харьков, 1988.—С. 192—193.
10. Литвинов Г. С., Довбешко Г. И. Анализ вкладов биополимеров в колебательные спектры вирусных нуклеопротеидов // Материалы 6-го координац. совещ. по спектроскопии полимеров.—Минск, 1989.—С. 74.

Межотраст. науч.-инж. центр по физике живого
и микроволн. резонанс. терапии «Відгук» при КМ УССР, Киев

Получено 14.05.91