

- тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии / Т. Л. Пятигорская, О. Ю. Жилкова, В. С. Шелковский и др. // Там же.— 1985.— 29, N 10.— С. 1235—1241.
38. *Hydrolysis of 1,1,1-phosphinothioylidinetriazidine (Thiotepa) in aqueous solution* / Т. Л. Pyatigorskaya, O. Yu. Zhilkova, V. S. Shelkovsky et al. // *Biomed. Environ. Mass Spectr.*— 1987.— 14, N 4.— P. 143—148.
 39. *Суходуб Л. Ф.* Применение мягкоионизационной масс-спектрометрии в биохимии // *Укр. биохим. журн.*— 1989.— 61, № 4.— С. 16—30.
 40. *Mellet L. B., Wood L. A.* The comparative physiological disposition of the thioTEPA and TEPA in the dog // *Cancer Res.*— 1960.— 20, N 4.— P. 524—532.
 41. *Effects of pH and temperature on the stability and decomposition of N,N,N-triethylenthiothiophosphoramidate in urine and buifer* / B. E. Cohen, M. J. Egorin, M. S. B. Nayyar, P. L. Gutierrez // *Ibid.*— 1984.— 44, N 5.— P. 4312—4316.
 42. *Косевич М. В.* Молекулярный анализ лекарственных препаратов и продуктов их взаимодействия с ДНК и ее компонентами по данным мягкоионизационной масс-спектрометрии: Дис. ... канд. физ.-мат. наук.— Харьков, 1989.— 180 с.
 43. *Прямое наблюдение аддуктов азотистых оснований с тио-ТЭФ с помощью мягкоионизационной масс-спектрометрии* / Л. Ф. Суходуб, М. В. Косевич, В. С. Шелковский и др. // *Биофизика.*— 1990.— 35, № 4.— С. 549—551.
 44. *Химиотерапия злокачественных опухолей* / Под ред. Н. Н. Блохина.— М.: Медицина, 1977.— 320 с.
 45. *Росс У.* Биологические алкилирующие вещества.— М.: Медицина, 1964.— 240 с.
 46. *Масс-спектрометрическое исследование взаимодействия тиофосфамида с основаниями нуклеиновых кислот* / Л. Ф. Суходуб, В. С. Шелковский, М. В. Косевич и др. // *Докл. АН СССР.*— 1985.— 283, № 3.— С. 714—716.
 47. *Nucleic acid base complexes with thioTEPA as revealed by field ionization mass spectrometry* / L. F. Sukhodub, V. S. Shelkovsky, M. V. Kosevich et al. // *Biomed. Environ. Mass Spectr.*— 1986.— 13, N 4.— P. 167—170.
 48. *Дубинин Н. П., Сапрыкина Е. Г.* Цепная реакция при химическом мутагенезе // *Докл. АН СССР.*— 1964.— 158, № 4.— С. 956—959.
 49. *Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н., Андреев В. С.* Высокоактивные вторичные алкилирующие мутагены // *Генетика.*— 1966.— 2, № 4.— С. 269—278.
 50. *Harrap K. R., Gascoigne E. W.* The interaction of bifunctional alkylating agents with the DNA of tumor cells // *Eur. J. Cancer.*— 1976.— 28.— P. 269—278.
 51. *Направления алкилирования дезоксигуанина и дезоксигуаниловой кислоты тио-ТЭФом* / А. М. Серебряный, Г. В. Андриевский, А. П. Беккер и др. // *Биоорг. химия.*— 1986.— 12, № 4.— С. 499—506.
 52. *Строение продуктов модификации нуклеотидов и ДНК этиленимином и тио-ТЭФом* / А. М. Серебряный, Г. В. Андриевский, А. П. Беккер и др. // Там же.— 1987.— 13, № 6.— С. 787—792.
 53. *Singer B.* The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis // *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.*— 1975.— 15.— P. 219—284.
 54. *Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И.* Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленимина. 1. Алкилирование оснований // *Биоорг. химия.*— 1990.— 16, № 7.— С. 987—989.
 55. *Пацковский Ю. В., Волощук Т. П., Потопальский А. И.* Некоторые особенности реакции полинуклеотидов с тиофосфамидом // *Биополимеры и клетка.*— 1989.— 5, № 5.— С. 64—70.

Отд-ние прикл. физики ин-та металлофизики АН УССР,
Сумы

Получено 30.04.91

УДК 577.3:535.338.41

Г. С. Литвинов

ИНФРАКРАСНЫЕ КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ ФИТОВИРУСОВ И ИХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Исследованы спектры ИК-поглощения белков, РНК и вирионов спирального (вирус табачной мозаики) и сферического (вирус крапчатости гвоздики) типов симметрии. Обнаружено, что характеристики спектров, такие как общее число полос, их группировка в частотные интервалы, наличие характерных по интенсивности, полуширине и частоте полос (амид А, амид В, амид I, амид 2, фосфат 1, фосфат 2 и др.), весьма близки как для целостных вирусных нуклеопротеидов, так и для их биохимических компонентов. Наряду с этим наблюдаются и достоверные различия, по которым возможно дифференцировать между собой и вирионы, и входящие в них биополимеры.

© Г. С. ЛИТВИНОВ, 1991

Введение. Спектральные исследования широко и успешно применяются в современной физико-химии в целях установления фундаментальных закономерностей взаимодействия вещества с электромагнитным излучением, определения структуры атомов и молекул, идентификации веществ и анализа чистоты препаратов. Для молекулярной биологии нынешний этап проникновения спектроскопических подходов и методов характеризуется тем, что наряду с интенсивным использованием ультрафиолетовой спектрофотометрии, где наблюдаются оптические $\Pi-\Pi^*$ -переходы валентных электронов биологических макромолекул, все шире исследуются колебательные спектры, несущие уникальную информацию о физико-химическом строении и энергетической структуре вещества. Причем в отличие от УФ-спектров, где обычно в доступной для изучения области регистрируется одна и, как правило, бесструктурная широкая полоса поглощения (или люминесценции), колебательные спектры биологических объектов насчитывают до ста и более компонентов. Это существенно расширяет аналитические возможности спектроскопии для решения проблем физико-химической биологии. Следует, однако, признать, что, несмотря на большие достижения колебательной спектроскопии в изучении неорганических и простейших органических, преимущественно углеводородных соединений, ее потенциальные возможности для молекулярной биологии используются недостаточно активно. Прежде всего изложенное справедливо по отношению к молекулярной вирусологии, результаты которой традиционно являются составляющей фундаментальных исследований молекулярной биологии и генетики, определяющих, в свою очередь, прогресс биотехнологии и биохимической инженерии. В частности, в то время как известны значительные достижения в спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) [1] и инфракрасного поглощения (ИКП) [2, 3] низкомолекулярных биомолекул и биополимеров, имеется совсем немного работ [4—7] по колебательной спектроскопии вирусов, простейших автономно существующих и эволюционирующих комплексов важнейших функциональных биополимеров — белка и нуклеиновой кислоты.

В связи с этим нами были проведены систематические исследования спектров ИКП вирусов табачной мозаики (ВТМ) и крапчатости гвоздики (ВКГ). Эти фитовирусы, несмотря на один и тот же физико-химический тип генома — небольшую, в несколько мегадальтон, одноцепочечная РНК с близким для обоих вирусов процентным составом нуклеотидов, — кардинально различаются симметрией белкового капсида. ВТМ — классический представитель ротационно-трансляционной (спиральной), а ВКГ — икосаэдрической (кубической) симметрии. Капсиды построены из относительно низкомолекулярных (молекулярная масса — десятки килодальтон) белковых молекул одной физико-химической структуры для каждого из вирусов. Следует, однако, иметь в виду, что при биологической и биохимической простоте целостные вирионы с позиций колебательной спектроскопии чрезвычайно сложны: молекулы белков насчитывают несколько тысяч, а молекулы РНК — несколько сот тысяч атом-атомных ковалентных связей, что означает наличие громадного числа колебательных степеней свободы. Поэтому наряду с вирионами необходимо было исследовать их молекулярные компоненты — белки и РНК, полученные методами мягкого, неразрушающего разделения. Правомерность такого подхода отвечает концепции интегратизма [8] и с биологической точки зрения подтверждается сохранением функций компонентов, что демонстрируется в опытах по самосборке вирусов и по сохранению инфекционности депротенизированной РНК [9].

Материалы и методы. Накопление ВТМ (дикий штамм) и ВКГ производилось на растениях *Nicotiana debnei* и *Dianthus caryophyllus* в лабораторных условиях. ВТМ выделяли по методике, описанной в [10], ВКГ — в [11]. Для очистки применяли дифференциальное центрифугирование, центрифугирование в градиентах концентрации сахаразы и CsCl с последующим диализом против бидистиллята H_2O . Ви-

рионы разделяли методом [12] щелочной депротеинизации для ВТМ и по методике с использованием осмотического шока для ВКГ [13]. РНК в обоих случаях осаждали этанолом и низкоскоростным центрифугированием. Препараты фракций белка и РНК очищали диализом против бидистиллята H_2O . Чистоту и гомогенность препаратов контролировали с помощью электронной микроскопии, люминесцентной и абсорбционной УФ-спектрофотометрии.

Высокоочищенные концентрированные суспензии вирусов и их биохимических компонентов наносили на поверхность подложек из

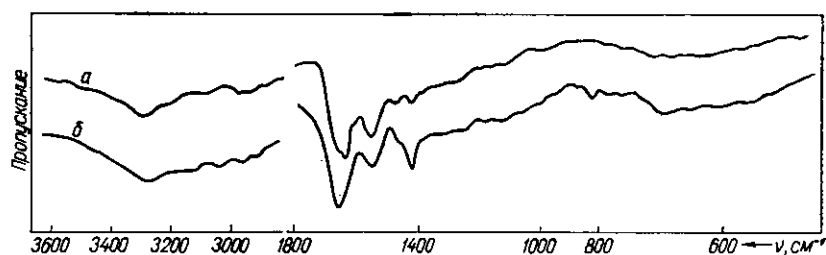


Рис. 1. Спектры ИК-поглощения белков ВТМ (а) и ВКГ (б)

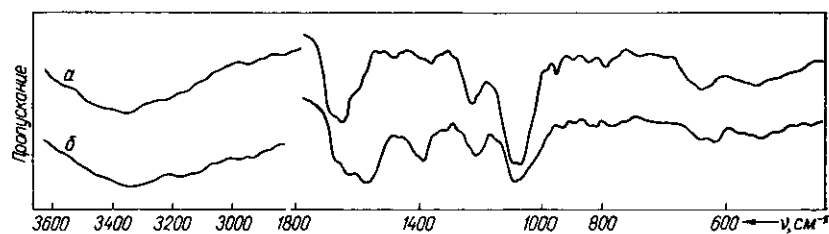


Рис. 2. Спектры ИК-поглощения РНК ВТМ (а) и ВКГ (б)



Рис. 3. Спектры ИК-поглощения нуклеопротеидов ВТМ (а) и ВКГ (б)

прозрачных в ИК-диапазоне материалов (KPS-5, высокоомный кремний, германий, CaF_2). Высушивание производили в термостате при $30^\circ C$ или под вакуумом. Для низкотемпературных исследований применяли специальный термостат с окнами из KPS-5. Спектры ИКП исследовали на спектрометрах в условиях, позволявших регистрировать волновые числа полос с точностью $\pm 2 \text{ см}^{-1}$, относительную интенсивность полос — $\pm 3 \%$, наблюдаемую полуширину и расщепления при аппаратной функции 1 см^{-1} . Результаты исследований усредняли в 5—7 повторах.

Результаты и обсуждение. Типичные спектрограммы изученных вирусов и их молекулярных компонентов приведены на рис. 1—3, а в табл. 1—3 содержатся усредненные результаты обработки спектров.

Спектры белков. Из полученных спектрограмм и таблиц частот следует, что спектры белков ВТМ и ВКГ весьма сходны. Так, для них типичным является наличие четырех областей, где имеют место

Таблица 1

Параметры полос ИКП-белков-вируса табачной мозаики и вируса крапчатости
звездочки

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|------------------------------------|---------|--|------------------------------------|---------|--|--|
| $\nu_{\text{ист}}, \text{см}^{-1}$ | $I, \%$ | $\Delta\nu_{\text{ист}}, \text{см}^{-1}$ | $\nu_{\text{ист}}, \text{см}^{-1}$ | $I, \%$ | $\Delta\nu_{\text{ист}}, \text{см}^{-1}$ | |
| 415 | — | — | 415 | — | — | — |
| 425 | — | — | 426 | — | — | Скелетные неплоские деформационные колебания, в том числе (N—C=O) |
| 457 | — | — | 460 | — | — | — |
| 520 | — | — | 510 | — | — | — |
| — | — | — | 560 | 39 | 100 | Амид 5, амид 6 |
| — | — | — | 600 | 42 | — | Амид 4, N—H, C=O |
| 615 | 42,4 | 20 | — | — | — | Неплоские изгибающиеся колебания белка |
| — | — | — | 630 | — | — | — |
| — | — | — | 640 | — | — | — |
| — | — | — | 653 | — | — | — |
| 705 | 45,4 | 15 | 696 | 40 | 100 | Либрационное колебание OH в кристаллизационной H ₂ O |
| 750 | 27,2 | 15 | — | — | — | C—H-неплоское деформационное качание, амид 5 |
| — | — | — | 830 | — | — | C—C-валентное колебание |
| — | — | — | 920 | — | — | — |
| 945 | 12,1 | 51 | — | — | — | C—CH ₃ -валентное колебание |
| 970 | — | — | 970 | — | — | C—O-валентное колебание |
| — | — | — | 1047 | 9,0 | — | — |
| 1072 | 21,2 | — | 1080 | 12 | — | C—CH ₂ |
| 1130 | 19,3 | — | 1120 | 13 | — | CH ₂ —CO-валентное |
| 1160 | 7,2 | — | 1160 | 11 | — | CH ₂ -качание |
| 1170 | 7,2 | — | — | — | — | — |
| 1240 | 18,2 | 35 | 1238 | 21 | 56 | Валентное C—CO ₂ ⁻ , амид 3 |
| 1300 | — | — | 1300 | 18 | — | CH-валентное плоское+H-плоское изгибающееся колебание |
| 1320 | 12,1 | — | 1315 | 18,1 | — | CH ₂ -изгибающееся колебание |
| 1345 | 12,1 | — | 1345 | — | — | — |
| 1390 | — | — | 1380 | 35,0 | — | CH ₂ -симметричное деформационное колебание (изгиб) |
| 1408 | 24,3 | 36 | 1400 | — | 34 | CH ₂ -изгибающееся колебание |
| 1425 | — | — | — | — | — | — |
| 1450 | — | — | 1440 | — | — | CO ₂ ⁻ -симметричное валентное (Глу, Асп) |
| 1440 | — | — | — | — | — | CH ₂ -асимметричное колебание |
| — | — | — | — | — | — | CH ₃ -асимметричное деформационное изгибающееся колебание |
| 1470 | 24,3 | 36 | 1440 | 22,0 | 24 | CO ₂ валентное колебание |
| 1480 | — | — | 1492 | — | — | — |
| 1500 | — | — | 1502 | — | — | — |
| 1510 | — | — | 1510 | — | — | Амид 2 |
| 1520 | — | — | — | — | — | Амид 2 |
| — | — | — | 1532 | — | — | NH-изгибающееся деформационное |
| 1540 | 100 | 54 | 1540 | 100 | 54 | Плоское C—N-валентное |
| 1575 | — | — | — | — | — | — |
| 1590 | — | — | — | — | — | C—O-асимметричное валентное |
| — | — | — | 1608 | — | — | — |
| — | — | — | 1620 | — | — | — |
| 1632 | — | — | 1632 | — | — | Амид 1 |
| — | — | — | 1638 | — | — | — |
| 1650 | 166,7 | 74 | 1652 | 175 | 73 | C=O-валентное |
| — | — | — | 1662 | — | — | — |
| 1670 | — | — | 1670 | — | — | — |
| 1690 | — | — | 1690 | — | — | — |
| 1705 | — | — | 1700 | — | — | COOH, Глу, Асп асимметричное валентное |
| — | — | — | 1720 | — | — | — |
| 2800 | — | — | 2800 | 18,0 | — | — |
| 2840 | — | — | — | — | — | CH ₂ -асимметричное валентное плоское колебание |
| 2860 | — | — | 2860 | — | — | — |
| 2880 | — | — | 2880 | — | — | CH ₂ -симметричное валентное |
| — | — | — | 2920 | — | — | — |
| 2930 | 21 | 47 | 2935 | 37 | — | CH ₂ -асимметричное валентное неплоское |
| 2965 | 18 | 48 | 2965 | — | — | CH ₃ -асимметричное валентное |
| — | — | — | 2986 | — | — | — |
| 3000 | — | — | — | — | — | C=C—H-валентное (RCH—CH ₂) |
| 3055 | 12 | — | 3060 | 55 | 48 | Амид В |
| 3070 | — | — | — | — | — | 2×амид 2 (Ферми-резонанса) |

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|---|--------------|---|---|--------------|---|--|
| $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | <i>I</i> , % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | <i>I</i> , % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | |
| — | — | — | 3160 | — | — | — |
| 3200 | 54,6 | — | 3200 | 74,0 | — | — |
| 3280 | 84,8 | — | 3290 | 106 | 32 | NH ₂ -валентное Амид А (N—H-валентное симметричное и асимметричное) |
| 3300 | — | — | 3310 | 100 | — | |
| 3365 | 36,3 | — | — | — | — | N—H-валентное |
| 3450 | 24,3 | — | 3450 | 50,0 | — | O—H-валентное колебание кристаллизацион- ной H ₂ O |

Примечание. $\nu_{\text{ист}}$ — истинная частота колебания; *I* — поглощение; $\Delta\nu$ — полуширина полосы.

Таблица 2

Параметры полос ИКП РНК вируса табачной мозаики и вируса крапчатости гвоздики

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|---|--------------|---|---|--------------|---|--|
| $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | <i>I</i> , % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | <i>I</i> , % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | |
| 430 | — | — | 428 | — | — | — |
| 454 | 3,8 | 10 | — | — | — | — |
| — | — | — | 470 | — | — | — |
| 485 | 18,1 | 12 | — | — | — | — |
| — | — | — | 520 | — | — | N—H-деформационное неплоское колебание оснований |
| — | — | — | 520 | — | — | |
| 546 | 28,5 | 85 | 547 | 31 | 75 | — |
| — | — | — | 570 | — | — | — |
| — | — | — | 600 | 40 | 20 | — |
| 615 | 28,5 | 20 | — | — | — | — |
| 632 | 36,3 | 25 | 627 | — | — | — |
| 647 | 28,5 | 25 | 642 | 28 | 25 | — |
| — | — | — | 650 | 30 | 15 | — |
| 690 | — | — | 690 | — | — | Вибрационное колебание O—H в кристалли- зационной H ₂ O |
| — | — | — | 725 | — | — | — |
| 730 | 5,1 | 15 | 730 | 8 | 14 | C—H-деформационное колебание оснований |
| 765 | 5,1 | 35 | 762 | — | — | O—P—O-симметричное валентное, фосфат 4 |
| — | — | — | 777 | — | — | — |
| 782 | 13,0 | 8,0 | 782 | — | — | N—H-неплоское колебание оснований |
| 795 | — | — | 798 | — | — | — |
| 800 | 10,4 | 26 | — | — | — | — |
| 810 | — | — | 810 | 16 | 53 | O—P—O-асимметричное валентное колебание |
| 820 | 11,7 | 14 | 820 | — | — | Фосфат 6+симметричное валентное |
| — | — | — | 862 | 16 | 35 | — |
| 870 | 14,3 | 10 | 870 | — | — | C—C=O рибозы |
| 885 | 10,4 | 20 | 880 | — | — | — |
| 910 | — | — | 912 | — | — | C—C-валентное колебание оснований и рибо- зо-фосфатное деформационное колебание |
| 916 | 10,4 | 10 | 920 | 15 | 16 | (P—O—P и P—OH, C—O-валентное и P—O—C-валентное |
| 930 | — | — | — | — | — | — |
| 962 | 18,1 | — | 962 | — | — | — |
| 975 | — | — | 982 | — | — | — |
| 1000 | 15,6 | 10 | 1000 | — | — | — |
| 1025 | — | — | 1015 | — | — | — |
| 1047 | — | — | 1048 | 75 | — | C—O-валентное колебание рибозы |
| — | — | — | 1062 | — | — | — |
| 1070 | — | — | 1078 | — | — | — |
| 1090 | 100 | 45 | 1088 | 100 | — | Симметричное валентное колебание O—P—O |
| 1105 | 90,2 | 55 | 1108 | 104 | — | Симметричное валентное колебание P—O—C |
| 1115 | — | — | 1120 | — | — | — |
| — | — | — | 1130 | — | — | CH ₂ —CO |
| — | — | — | 1140 | — | — | — |
| — | — | — | 1150 | — | — | — |
| 1178 | 29,9 | 25 | 1175 | — | — | CH ₂ |
| 1212 | — | — | 1210 | — | — | — |
| 1220 | — | — | 1220 | — | — | P=O валентное при водородной связи |
| 1230 | — | — | — | — | — | — |
| 1242 | 46,8 | 68 | 1248 | 62 | 60 | Асимметричное валентное P—O—P—O |
| 1250 | — | — | — | — | — | — |

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|---|------|---|---|------|---|---|
| $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | |
| 1260 | — | — | 1270 | — | — | — |
| 1290 | — | — | 1290 | — | — | Р—О-валентное, фосфор+цитозин |
| 1305 | — | — | — | — | — | — |
| 1340 | 3,8 | 15 | 1330 | 14 | — | — |
| — | — | — | 1350 | — | — | — |
| — | — | — | 1360 | — | — | Смешанные колебания оснований |
| 1380 | 13 | 20 | 1380 | — | — | — |
| 1402 | 7,8 | 20 | 1397 | 40 | 54 | — |
| 1410 | — | — | — | — | — | — |
| 1420 | 8,5 | 19 | 1420 | — | — | — |
| — | — | — | 1428 | — | — | — |
| 1468 | 11 | 6 | — | — | — | — |
| 1480 | 11,7 | 8 | 1485 | — | — | С=C-колебания оснований |
| 1495 | 11,7 | 16 | 1495 | — | — | — |
| 1530 | 9,1 | — | 1530 | 25 | 24 | С=N, С=C (пиримидиновые колебания) |
| 1540 | 9,1 | 18 | — | — | — | — |
| — | — | — | 1570 | — | — | — |
| — | — | — | 1577 | — | — | — |
| 1595 | 26 | 15 | — | — | — | — |
| 1612 | 38,9 | 46 | 1603 | 11 | 74 | С=N-валентное, Н ₂ -деформационное колебание аденина |
| — | — | — | 1620 | — | — | — |
| 1633 | — | — | — | — | — | Плоские С=О, С=C урацила и цитозина |
| 1645 | — | — | — | — | — | NH ₂ гуанина |
| 1652 | — | — | 1652 | 105 | 44 | С=О, С=C урацила |
| 1665 | 70,1 | 56 | 1662 | — | — | — |
| 1680 | — | — | — | — | — | NH плоское деформационное колебание урацила, NH ₂ |
| 1690 | 65 | 56 | 1687 | 85 | 53 | С=О-валентное, NH ₂ |
| 1703 | — | — | 1700 | — | — | — |
| — | — | — | 1710 | — | — | С=О-валентное урацила, цитозина |
| 1730 | 9,8 | 6 | — | — | — | С=О-валентное эфиров |
| 2800 | — | — | 2800 | — | — | СН ₂ -симметричное валентное |
| — | — | — | 2820 | — | — | — |
| 2870 | 5,0 | 50 | — | — | — | — |
| 2920 | 5,0 | — | 2920 | 20 | — | СН ₂ -асимметричное валентное |
| 2960 | 6,5 | 46 | 2960 | 24 | — | — |
| 2980 | 4 | — | 2980 | 32 | — | С—СН ₂ -асимметричное валентное, С—Н |
| — | — | — | 3140 | — | — | — |
| 3200 | 51,9 | 45 | 3200 | 62 | — | N—H-валентное симметричное и асимметричное аденина, гуанина, цитозина |
| 3360 | 64,9 | 350 | 3350 | 75 | 400 | — |
| 3450 | 58,4 | — | 3450 | 62 | — | О—H-валентное кристаллизационной Н ₂ О |
| 3600 | 32,5 | — | — | — | — | — |

Таблица 3

Параметры полос ИКП рибонуклеопротеидов вируса табачной мозаики и вируса крапчатости гвоздики

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|---|------|---|---|------|---|--|
| $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | |
| 415 | 17,5 | 12 | 415 | — | — | Скелетные неплоские деформационные колебания пептидной связи |
| 427 | — | — | 425 | — | — | — |
| 455 | 30,5 | 20,0 | 460 | — | — | N—H, С=О-неплоские изгибающиеся колебания белка |
| 480 | 32,5 | 30 | — | — | — | — |
| — | — | — | 505 | 16 | — | — |
| 525 | 75 | 75 | — | — | — | — |
| 548 | — | 75 | 552 | 32 | 100 | N—H-неплоские деформационные колебания оснований РНК |
| — | — | — | 580 | — | — | — |
| 615 | 82,5 | 80 | 600 | 37 | — | Амид 4, 5, 6 |
| 632 | — | — | 627 | 53 | — | Фосфат 6 |

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|--|------|--|--|------|--|---|
| $\nu_{\text{ист}}$, см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист}}$, см ⁻¹ | $\nu_{\text{ист}}$, см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист}}$, см ⁻¹ | |
| 645 | 84,5 | 100 | 645 | — | — | — |
| 657 | — | — | 657 | — | — | — |
| 700 | 70 | 6 | 700 | 30 | 100 | Либрационные колебания кристаллизационной H ₂ O |
| — | — | — | 723 | — | — | — |
| 730 | — | — | 730 | — | — | C—H-неплоское качание в белке |
| 750 | 42,5 | 11 | — | — | — | O—P—O-симметричные валентные колебания РНК |
| 765 | — | — | 760 | — | — | Амид 5, фосфат 5 |
| — | — | — | 777 | — | — | — |
| 782 | 25 | 6 | 780 | — | — | — |
| 795 | — | — | — | — | — | — |
| 800 | 10 | — | 798 | — | — | — |
| 810 | — | — | 810 | — | — | O—P—O-асимметричное валентное |
| 820 | 7,5 | — | 820 | — | — | Фосфат 4 |
| 830 | — | — | — | — | — | — |
| 860 | — | — | 860 | — | — | C—C—O-симметричное валентное рибозы |
| 870 | 7,0 | 30 | 870 | — | — | Рибозо-фосфатные, скелетно-цепочные |
| 885 | 5 | 16 | 880 | — | — | — |
| 910 | — | — | 912 | — | — | C—C-валентное, O—CH, P—O—P, P—OH, C—O-валентное, P—O—C-валентное |
| 918 | — | — | 920 | 12 | 16 | — |
| 930 | — | — | — | — | — | — |
| 945 | 22,5 | 25 | — | — | — | — |
| 962 | — | — | 962 | — | — | Фосфат 3 |
| 968 | — | — | — | — | — | — |
| 975 | 20 | 26 | 972 | 14 | 20 | — |
| — | — | — | 982 | — | — | — |
| 1000 | 18 | 20 | 998 | 12 | 15 | — |
| 1022 | — | — | 1020 | — | — | — |
| — | — | — | 1032 | — | — | C—O-валентное колебание рибозы |
| 1043 | — | — | 1040 | — | — | O—P—O-симметричное валентное |
| — | — | — | 1050 | — | — | O—P—O—C-симметричное |
| 1067 | — | — | 1062 | — | — | Фосфат 2 |
| — | — | — | 1080 | — | — | — |
| 1086 | 90 | 90 | 1088 | 100 | 106 | — |
| 1105 | 100 | — | 1100 | — | — | — |
| 1115 | 75 | — | 1122 | 85 | — | — |
| 1130 | 70 | — | 1135 | — | — | — |
| — | — | — | 1140 | — | — | — |
| 1160 | — | — | 1150 | — | — | — |
| 1178 | — | — | 1177 | — | — | — |
| 1210 | — | — | 1210 | — | — | — |
| 1222 | — | — | 1220 | — | — | P=O-валентное |
| 1225 | 50 | 26 | — | — | — | — |
| — | — | — | 1240 | 40 | 55 | — |
| 1242 | 80 | 55 | 1242 | 40 | 55 | O—P—O-асимметричное валентное (фосфат 1) |
| 1250 | — | — | — | — | — | — |
| 1270 | 60 | 25 | 1265 | — | — | — |
| 1300 | — | 20 | 1300 | — | — | — |
| 1320 | 65 | 45 | 1320 | — | — | — |
| — | — | — | 1330 | — | — | Смешанное колебание оснований РНК |
| 1345 | — | — | 1340 | — | — | Валентное C—CO ₂ ⁻ |
| — | — | — | 1360 | — | — | — |
| 1370 | — | — | 1380 | — | — | N—H-деформационное (амид 3) |
| 1390 | — | — | 1392 | — | — | — |
| 1402 | — | — | 1402 | 45 | 34 | — |
| 1408 | 55 | 35 | — | — | — | — |
| 1420 | 30 | 20 | 1420 | — | — | Смешанное колебание оснований РНК; CO ₂ -валентное симметричное, CH ₂ , CH ₃ -асимметричное деформационное белка |
| — | — | — | 1428 | — | — | — |
| 1440 | 25 | 20 | 1440 | 14 | 24 | — |
| 1450 | 50 | — | 1460 | — | — | — |
| 1470 | 45 | 36 | — | — | — | — |
| 1480 | — | — | 1486 | — | — | C=C-колебания оснований |
| 1495 | — | — | 1502 | — | — | — |
| 1510 | — | — | 1512 | — | — | — |
| 1520 | — | — | — | — | — | — |

| ВТМ | | | ВКГ | | | Отнесение |
|---|------|---|---|--------|---|---|
| $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | $\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | I, % | $\Delta\nu_{\text{ист.}}$ см ⁻¹ | |
| 1530 | — | — | 1532 | — | — | C=N, C=C-колебание пириимидина |
| 1538 | — | — | 1538 | 92 | 74 | |
| 1550 | 145 | 65 | — | — | — | |
| 1562 | — | — | 1560 | — | — | |
| 1575 | — | — | 1580 | — | — | |
| 1590 | — | — | — | — | — | |
| 1610 | — | — | 1607 | — | — | |
| — | — | — | 1620 | — | — | |
| 1635 | — | — | 1632 | — | — | |
| 1645 | — | — | 1640 | 190 | 83 | |
| 1652 | — | — | 1652 | — | — | |
| 1667 | 225 | 85 | 1662 | — | — | |
| — | — | — | 1673 | — | — | |
| 1680 | — | — | 1680 | — | — | |
| 1690 | — | — | 1690 | — | — | |
| 1706 | — | — | 1700 | — | — | |
| — | — | — | 1715 | — | — | |
| 1730 | 45 | 10 | — | — | — | |
| 2750 | — | — | — | — | — | |
| 2780 | — | — | — | — | — | |
| 2800 | — | — | 2800 | 18 | 50 | |
| 2840 | — | — | — | — | — | |
| 2855 | — | — | 2855 | 22 | — | |
| 2880 | 45 | 20 | 2880 | 26 | 45 | |
| — | — | — | 2920 | — | — | |
| 2945 | 80 | 25 | 2935 | 10 036 | 45 | |
| 2965 | 72,5 | 25 | 2965 | 10 536 | 45 | |
| — | — | — | — | — | — | C—H, C—H ₂ , CH ₃ , N—H, N—H ₂ , N—H ₃ ⁺ -валентные симметричные и асимметричные колебания белка, а также рибозы и оснований РНК |
| 2990 | — | — | 2990 | — | — | |
| 3000 | — | — | — | — | — | |
| 3048 | 15 | 35 | 3050 | — | — | |
| 3070 | 20 | 35 | 3075 | 13 | 13 | |
| — | — | — | 3150 | — | — | |
| 3200 | 13 | — | 3195 | 12 | — | |
| — | — | — | 3250 | — | — | |
| 3280 | — | — | — | — | — | |
| 3300 | 220 | — | 3290 | 142 | 300 | |
| 3310 | — | — | 3310 | — | — | |
| — | — | — | 3350 | 124 | — | |
| 3365 | — | 380 | — | — | — | |
| 3390 | — | — | 3390 | 103 | — | |
| 3450 | 200 | — | 3450 | 53 | — | |
| 3600 | 75 | — | 3600 | — | — | |

характерные особенности. В области 460—800 см⁻¹ наблюдается квазинепрерывная полоса (полуширина 250 см⁻¹), образованная двумя широкими (полуширина ~100 см⁻¹) полосами средней интенсивности, на фоне которых наблюдаются 7—8 слабых пиков. В интервале 900—1750 см⁻¹ обнаруживаются около 30 слабых и средних полос полушириной 30—40 см⁻¹, среди которых выделяется дублет сильных полос с частотами 1540 и 1650 см⁻¹, имеющих сложную тонкую структуру. Между 1750 и 2800 см⁻¹ отчетливые максимумы поглощения, связанные с белками, не регистрируются, наблюдается плавный подъем поглощения в высокочастотную область. На фоне этого подъема выделяется триплет полос с частотами около 2880, 2930 и 2965 см⁻¹. Далее обращают на себя внимание три перекрывающихся слабовыраженных максимума в районе 3200—3310 см⁻¹, за которыми следует плавно спадающее крыло поглощения, оканчивающееся вблизи 3600 см⁻¹.

Общность спектров проявляется также в числах наблюдаемых полос ИКП, достигающих 50 и 54 у белков ВТМ и ВКГ соответственно.

Необходимо отметить, что наблюдаемое число полос во много раз меньше, чем рассчитанное по формуле для полного числа колебаний этих белковых молекул. Для молекулы белка ВТМ изученного штамма, состоящей из 158 аминокислотных остатков с общим количеством атомов около 2400, расчет по известной формуле $N_{\text{кол}} = 3 \cdot N_{\text{ат}} - 6$ предсказывает свыше 7000 колебаний. При рассмотрении белка как частично упорядоченного кристалла, что в большой степени справедливо для пептидного остова, в котором различаются только концевые (COOH и NH_3^+) группы, а $\text{CH}_2\text{—CONH}$ -связь повторяется 157 раз, полное число колебаний в пептидной цепи должно рассчитываться по формуле $N_{\text{кол}} = 3\sigma r - 4$, где $r = 7$ — полное число атомов в повторяющейся группе; σ — число групп в элементарной ячейке биополимерной цепи [14].

Для белков с β -укладкой цепи $\sigma = 2$, поскольку повторяется двугранный элемент, образованный двумя идентичными по химическому составу, но неэквивалентными по пространственному расположению пептидными группами. Для белков со спиральной укладкой аминокислотных остатков период идентичности (шаг спирали), выраженный числом остатков, может быть иным, например, $\sigma = 3,6$ [15]. Тогда $N_{\text{кол}} \approx 80$. В первом приближении без учета фактор-группового расщепления для внутримолекулярных колебаний атомов пептидной группы можно принять, что $\sigma = 1$, и тогда число этих колебаний равно 17, если принимать во внимание атомы водорода в CH_2R (где R — белковый радикал аминокислотного остатка), и в NH -группах равно 8, если эти группы рассматривать как одну частицу. Таким образом, более чем 1100 атомам пептидного остова белка ВТМ должно отвечать только 8 или 17 колебаний. Вполне понятно, что колебания атомов пептидной связи как регулярно (157 раз) повторяющегося элемента цепи дают наибольший вклад в поглощение и им должны отвечать наиболее интенсивные полосы поглощения, известные как амид I — амид 7 и амид A [14]. Вместе с тем при всем разнообразии боковых радикалов и в них имеется целый ряд химически идентичных групп. Так, все боковые радикалы содержат C—H - и C—C -связи, N—H -связи присутствуют в боковых радикалах лизила, аргинила, глутамила, аспарагила, гистидила, триптофанила и пролила, C—O — у остатков глутаминовой, аспарагиновой кислот и их амидов, O—H -группа — у глутамила, аспарагила, серила, тирозила, треонила. Вследствие этого даже с учетом того обстоятельства, что одинаковые химические группы находятся в разном силовом окружении, их колебательные частоты должны если не совпадать, то иметь близкие значения. Итак, общее число наблюдаемых полос в ИКП белков за счет такого случайного вырождения должно уменьшаться в десятки раз, что и подтверждается нашими и другими экспериментами по белкам невирусного происхождения [14].

В пользу такого подхода, рассматривающего уменьшение числа наблюдаемых колебаний в белках до нескольких десятков (хотя колеблются тысячи атомов), свидетельствует и тот факт, что в ИКП белка ВКГ наблюдаемое число компонентов спектра ИКП почти такое же, как и белка ВТМ, несмотря на более чем двукратное превышение количества аминокислотных остатков в молекуле белка ВКГ (382, состоящих из ~ 5300 атомов) по сравнению с ВТМ. Несколько большее число наблюдавшихся полос в спектре белка ВКГ может быть обусловлено большим разнообразием его аминокислотного состава — в белке ВКГ имеются все 20 аминокислотных остатков, а в белке ВТМ — только 18 (гистидил и метионил отсутствуют) [16].

Сходство ИКП-спектров обоих вирусов проявляется также и в близости или даже совпадении частот колебаний, например, 3450 см^{-1} (O—H -валентное колебание кристаллизационной воды), $3060\text{—}3070 \text{ см}^{-1}$ (амид B, Ферми-резонансная полоса 2ν амид 2, резонирующая с полосой амид A), слабая полоса с частотой 2800 см^{-1} (C—H -валентное колебание), частоты скелетных колебаний в интервале $400\text{—}460 \text{ см}^{-1}$ и некоторые другие. Кроме того, в спектрах белкового компонента обоих вирусов наиболее интенсивными являются одни и

те же полосы поглощения, соответствующие валентным N—H и C=O, C—O и деформационным N—H-колебаниям, т. е. амид А, амид 1, амид 2 с волновыми числами вблизи 3300, 1650 и 1540 см⁻¹. (Здесь уместно отметить, что, по нашим оценкам, интенсивность поглощения (оптическая плотность) для наиболее интенсивных полос (амид 1, амид 2) в 5—10 раз меньше таковой этих белков в полосе II—II*-перехода в УФ-диапазоне при $\lambda=280\pm 1$ нм [11].)

Однако нередко при совпадении частот колебаний атом-атомных связей имеет место заметная разница в их относительных интенсивностях в спектрах разных белков. Так, частоте 1300 см⁻¹ в белке ВТМ соответствует крыло очень слабой интенсивности (5 отн. ед.), а в белке ВКГ — это полоса средней (18 отн. ед.) пиковой интенсивности. Наиболее существенные различия в спектрах ИКП белков ВТМ и ВКГ проявляются в интервале между 500—950 см⁻¹, где у белка ВТМ наблюдаются полосы с частотами 520, 615, 705, 750 и 945 см⁻¹, а у белка ВКГ — полосы с частотами 510, 560, 600, 630, 650, 696, 830 и 920 см⁻¹. Эти частоты более всего обусловлены деформационными неплоскими колебаниями N—H-, C—H-, C—O-связей и их несовпадение указывает, по-видимому, на различную укладку цепей белков этих вирусов, отражая вместе с тем и различный процентный аминокислотный состав [16, 17]. Полуширины полос ИКП обоих белков имеют значения от 20 до 400 см⁻¹. Наибольшей полушириной обладает сложная полоса с максимумом вблизи 3300 см⁻¹, обусловленная валентными колебаниями с участием протона (N—H-, O—H-колебания), вовлекаемого в водородную связь. Вместе с тем группа относительно узких линий в интервале 2850—3000 см⁻¹, по-видимому, связана с C—H-колебаниями. СН₂ и СН₃ атомных групп пептидной связи и боковых радикалов, протоны которых не участвуют или слабо участвуют [18] в водородных взаимодействиях, приводящих обычно к большим затуханиям и, как следствие, к значительным полуширинам спектральных полос. Нужно также отметить, что интенсивность высокочастотного крыла этой полосы существенно увеличивалась с повышением влажности образцов, что позволило нам отнести частоту 3450 см⁻¹ за счет колебаний кристаллизационной воды.

Обращает на себя внимание также и факт полного совпадения полуширин полос амид 1 и амид 2 у обоих белков, составляющих величины 54,0 и 74,0 см⁻¹ соответственно. Значения полуширин этих полос также указывают на уширение за счет водородных взаимодействий.

Наблюдаемое уширение обусловлено, очевидно, не только сильным взаимодействием между водородно-связанными или заряженными группами (СО₂⁻, NH₃⁺), колебания которых вносят вклад в амид 1 и амид 2, но также и неоднородным уширением вследствие того, что химически одинаковые атом-атомные связи, находясь в различных частях белковой молекулы и входя в разные боковые радикалы, пребывают в неэквивалентном силовом окружении. Последнее обстоятельство приводит к разбросу частот одинаковых связей в окрестности общего центрального максимума. Указанием на неоднородное уширение служит также несимметричность контуров полос и их тонкая структура. Так, в полосе амид 1 насчитываются 7 и 10 компонентов расщеплений у белков ВТМ и ВКГ соответственно, а в полосе амид 2 — по 5 компонентов расщеплений для обоих белков. Сложную тонкую структуру имеют и многие другие полосы ИКП изученных белков. Вместе с тем следует иметь в виду и факт перекрывания полос колебаний разных связей, например, СО₂⁻-валентных и NH-деформационных колебаний, попадающих у различных аминокислот в один и тот же частотный интервал 1600—1750 см⁻¹ [16].

Спектры нуклеиновых кислот. Подобно тому, как это имело место у белков, спектры ИКП нуклеиновых кислот ВТМ и ВКГ близки один к другому. Общие контуры спектров при их наложении друг на друга различаются лишь в некоторых интервалах. Количество

наблюдаемых полос почти одинаково — 69 у РНК ВТМ и 72 у РНК ВКГ — и в тысячи раз меньше, чем должно быть по расчету из количества атомов: РНК ВТМ насчитывает более $2 \cdot 10^5$ атомов, а РНК ВКГ в несколько раз больше. Причины этого уменьшения, видимо, такие же, как для белков. Что касается возрастания числа полос по сравнению с белками, то оно может быть обусловлено большим количеством (18 в РНК против 7 в белке) атомов в регулярно, тысячи раз повторяющейся рибозо-фосфатной связи и большей регулярностью боковой цепи оснований нуклеиново-кислотного биополимера по сравнению с полипептидом. Химическая цепь РНК в целом более однородна, чем цепь белка. Так, пиримидиновые и пуриновые остатки имеют общее происхождение и структурно представляют собой ароматические простые (уридил и цитозил) и сложные (гуанил и аденил) кольца, состоящие из одинаковых элементов. В то же время урацил и цитозил (равно, как гуанил и аденил) почти не отличаются по физико-химической структуре между собой, различаясь, в основном, природой некоторых атомов, присоединяющихся к С-атомам кольца: NH_2 у цитозила и О у уридила, Н у аденила и О у гуанила. Таким образом, химическая регулярность РНК намного выше, чем структурных белков, что должно приводить к большей регулярности колебательного спектра по интенсивности полос, к большему числу мажорных колебаний и к более четкому выражению структуры, несмотря на большее на два порядка число возможных колебаний по сравнению с белками. Этот вывод подтверждается данными табл. 2 и рис. 2.

В отличие от спектров белков спектры РНК более равномерно заполнены — в области $400\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ наблюдаются около 60 полос поглощения, расположенных на расстоянии $15\text{--}30\text{ см}^{-1}$ друг от друга. Многие из них имеют сложную тонкую структуру. Подобно случаю белков в области $1750\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ максимумы полос поглощения первого порядка отсутствуют. Высокочастотная область ($2800\text{--}3600\text{ см}^{-1}$) включает в себя около 10 полос и простирается несколько дальше, чем у белков. Многие полосы ИКП РНК могут быть отнесены к колебаниям по аналогии с белками. Наряду с этим в спектрах нуклеиновых кислот имеются характеристические полосы, отсутствующие или слабопроявляющиеся в белках. В первую очередь это относится к валентным колебаниям Р—О-связей, имеющим максимумы вблизи 1090 см^{-1} (симметричное О—Р—О-колебание, фосфат 2) и $1242\text{--}1248\text{ см}^{-1}$ (антисимметричное О—Р—О-колебание связи, фосфат 1). Эти колебания проявляются в спектрах ИКП РНК с наибольшей пиковой интенсивностью.

При нормированной массе препаратов самое интенсивное колебание в РНК — фосфат 2 оказывается в 20—25 раз сильнее, чем колебание амид 1 белка, что совпадает с соответствующей величиной соотношения оптических плотностей нуклеиновых кислот и белков в УФП [10]. Вместе с тем подобно белкам одно и то же количество РНК обоих вирусов на частоте полосы фосфат 2 имеет поглощение в 5—6 раз меньше, чем в УФП на длине волны $260 \pm 1\text{ нм}$, характеристичной для РНК.

Интерес представляет интервал $1500\text{--}1750\text{ см}^{-1}$, где поглощение обусловлено С=C- и С=N-валентными и N—H-плоскими деформационными колебаниями атом-атомных связей рибозы и оснований. Подобные связи присутствуют и у белков. Однако в отличие от спектров ИКП белков, где перекрывание полос колебаний дает четкий дублет с максимумами вблизи 1540 и 1660 см^{-1} , для ИКП РНК здесь свойственна одна мультиплетная полоса, состоящая из 11—12 компонентов. Различается и структура поглощения в районе валентных С—Н-колебаний — для белков наблюдается триплет 2880 , 2930 и 2965 см^{-1} , а для РНК — триплетная полоса с максимумами на 2920 , 2960 и 2980 см^{-1} . Наряду с этим в ИКП РНК отсутствует полоса на частоте вблизи $3060/3070\text{ см}^{-1}$, соответствующая Ферми-резонансному колебанию амид В. Полоса 3200 см^{-1} в РНК значительно сильнее, чем в белках, что может быть обусловлено большей встречаемостью N—H-связи в

РНК по сравнению с белком. Наконец, в высокочастотной области дублетный пик наибольшего поглощения у белков находится на частоте 3280—3290 см⁻¹, а у РНК — на 3350—3360 см⁻¹ (ВКГ и ВТМ соответственно).

Полуширины полос ИКП изученных РНК имеют значения от 10 до 400 см⁻¹. В среднем они в 1,5—2 раза меньше, чем типичные полуширины полос ИКП белков. Этот факт согласуется с нашей интерпретацией, основанной на большей физико-химической регулярности нуклеиновых кислот по сравнению с белками, которая должна приводить к меньшему разбросу значений частот одноименных колебаний в цепи биополимера и, значит, к сужению уровней энергии и соответствующих им полос поглощения. Исключение при этом составляет поглощение в области высокочастотных колебаний (2880—3600 см⁻¹), имеющее близкую полуширину в белках и РНК. Этот факт естественно связывать с вкладом в поглощение в этой области полосы валентного колебания ОН-группы, обычно имеющего наибольшую частоту из всех колебаний с участием протона [2, 3]. Известно [19], что ОН-группа имеется в каждом мономере цепи РНК (в рибозе), а в белках ОН-группа присутствует лишь у 5 из 20 аминокислотных остатков. В связи с этим ОН-валентная полоса, будучи расположенной на высокочастотном краю поглощения в этой области (вблизи 3400—3450 см⁻¹) и являясь сильной по интенсивности ввиду высокой встречаемости, уширяет полосу поглощения и смещает ее максимум на 70 см⁻¹ в сторону более высоких частот по сравнению со спектрами белков. Такое же смещение наблюдалось нами при увлажнении образцов белка и РНК, однако, по вполне понятной причине, за счет ОН-колебаний связываемой, кристаллизационной воды.

Спектры вирусных нуклеотидов (см. рис. 3, табл. 3) представляют собой набор более 90 полос различной интенсивности и полуширины (данные по колебательным спектрам вирусов детализированы и уточнены по сравнению с нашими работами [20, 21]). 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 ИКП 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 О—Н-связей кристаллизационной воды, гидроксил-содержащих аминокислот белка и нуклеотидов, О=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 одинаковых, но пространственно неэквивалентных групп, находящихся в различном силовом окружении, приводит к тому, что поглощение в этом интервале носит характер квазиконтинуума, на фоне которого проявляются около 10 максимумов низкой пиковой интенсивности.

В интервале 800—1750 см⁻¹ наблюдаются, в основном, хорошо различающиеся, хотя и имеющие сложную внутреннюю структуру, полосы средней и высокой интенсивности. Здесь имеет место подъем общего фона (базовой линии) при переходе от 1300 к 1550—1660 см⁻¹, где расположена полоса кристаллизационной воды.

Специфичность спектров ИКП 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 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 до нулевого уровня.

Таким образом, в целом спектры ИКП ВТМ и ВКГ имеют много общего и на качественном уровне у них нет значительных отличий. Наряду с этим 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 (например, амид 1, амид 2, амид 3, амид В), так и для РНК (фосфат 1, фосфат 2 и др.).

При количественном анализе спектральных характеристик полос ИКП этих двух фитовирусов, принадлежащих к разным типам пространственной симметрии и содержащих разные абсолютные и относительные количества белка и РНК, обнаруживаются большие различия.

Так, у них заметно отличаются 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 интенсивных 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 , $782\text{—}780\text{ см}^{-1}$) 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 близким 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 полос антисимметричного валентного P—O—P -колебания практически совпадает для обоих вирусных нуклеопротеидов, имея значение 1242 см^{-1} . Однако их относительные пиковые интенсивности отличаются почти в два раза.

Весьма существенны различия в параметрах характеристических полос белков — амид 1, амид 2. Частоты центральных максимумов полос колебаний амид 1 равны 1667 и 1640 см^{-1} , а амид 2 — 1550 и 1538 см^{-1} для ВТМ и ВКГ соответственно. Как следует из табл. 3, 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. Частота широкого максимума, отвечающего Ферми-резонансной полосе 2ν амид 2, практически не отличается у ВТМ и ВКГ, находясь вблизи 3060 см^{-1} .

Наконец, следует отметить различия в характеристиках полос, максимумы которых для обоих вирусов лежат вблизи 3300 см^{-1} — частоты, соответствующей колебанию белка амид А, обусловленному валентным растяжением N—H -связи пептидной группы. Несмотря на ее огромную и близкую для обоих объектов полуширину ($360\text{—}380\text{ см}^{-1}$ при влажности около 70%) регистрируется достоверное различие в частотном положении максимумов — 3300 см^{-1} и дублет $3290/3310\text{ см}^{-1}$ для ВТМ и ВКГ соответственно. Различаются также относительная интенсивность и форма высокочастотного крыла этой полосы.

Влияние взаимодействий белок — нуклеиновая кислота, влажности и температуры. В целом ИК-спектры вирусов достаточно хорошо описываются на основе исследований их белков и ДНК. Как видно из сравнения данных табл. 1—3 и рис. 1—3, практически для каждой полосы из спектров белков или РНК можно найти соответствующую полосу в спектре вирусного нуклеопротеида.

Небольшие (в пределах 3—5 см⁻¹) наблюдаемые смещения частот чаще всего имеют место только для компонентов расщеплений, например, в полосах амид 1, амид 2 и обусловлены, по-видимому, неточностью определения волнового числа вследствие перекрытия большого числа полос в узком частотном интервале. Наряду с этим регистрируются и значительные изменения в частоте и форме некоторых полос. Так, в полосе фосфат 2 при переходе от свободной РНК к упакованной в капсид наблюдаются изменения дублета 1090—1105 см⁻¹: перераспределение интенсивностей и достоверное изменение частоты центрального максимума с 1090 до 1085 см⁻¹, что приводит в конечном итоге к изменению ее формы. Напротив, форма и структура полосы антисимметричного РО₂-колебания не изменяются заметно при упаковке РНК в белковый капсид. При этом, однако, изменяется отношение пиковой интенсивности полос фосфат 1 и фосфат 2: в свободном состоянии оно равно 2,0, а в связанном — 3,0, т. е. при образовании вириона, по-видимому, за счет взаимодействия белок—нуклеиновая кислота дипольный момент перехода, отвечающего РО₂-колебанию, изменяется по-разному для симметричного и антисимметричного движения. Значения полуширин этих полос уменьшаются при переходе к вириону со 100 до 90 см⁻¹ у фосфата 2 и с 68 до 55 см⁻¹ у фосфата 1. Полосы с частотами 1407 и 1470 см⁻¹ у белка не меняют полуширины, которая в вирионе и в свободном белке имеет значение около 36 см⁻¹. В противовес этому полуширины других полос ИКП РНК и белка увеличиваются в 1,5—2 раза, например, для полос с частотами 870, 965, 1000 см⁻¹ у РНК и амид 2, амид 1 у белка. Следует при этом отметить, что наблюдаемое увеличение полуширины и смещение максимума поглощения полосы амид 2 с 74 до 85 см⁻¹ при переходе к вириону может быть обусловлено перекрытием частот амид 2 белка и группы полос в интервале 1590—1690 см⁻¹ РНК. Оценить абсолютные изменения интенсивностей полос белка и РНК при их упаковке в вирион весьма трудно из-за взаимного перекрытия. Тем не менее, для некоторых полос это возможно. Например, очень слабая в свободном состоянии белка полоса на частоте 1300 см⁻¹ усиливается в вирионе в несколько раз, на что обращают внимание также авторы [7] при исследованиях ИКП ВТМ в растворе. Вместе с тем отношение интенсивности поглощения в дублете амид 1/амид 2, несмотря на перекрытие с полосами РНК, остается одинаковым в белке и в вирионе ВТМ, составляя величину ~1,7 при влажности около 70 %.

Изменения в спектрах ИКП при образовании целостных вирусов из молекулярных компонентов, подобные описанным для ВТМ, имеют место и для ВКГ. Так, перераспределяются интенсивности компонентов и форма полосы фосфат 2, сужаются полосы фосфат 1 и фосфат 2, уширяются полосы амид 1 и амид 2, некоторые другие полосы не изменяются по полуширине и относительной интенсивности.

Для выявления причин изменений в полосах ИКП белков и РНК при переходе к нативным вирионам были поставлены специальные эксперименты. Их суть заключалась в том, что две подложки с нанесенными на каждую из них отдельно препаратами РНК и белков в эквивалентных количествах, соответствующих соотношению РНК—белок в целостных вирусах (т. е. 1:19 для ВТМ и 1:4 для ВКГ [16, 17]), устанавливались в спектрометре одновременно в один канал. Таким образом, регистрируемый спектр соответствовал аддитивному поглощению белка и РНК, разделенных в пространстве, т. е. не взаимодействующих, как это имеет место в вирионе. Полученные результаты показали, что спектры ИКП составных образцов РНК—белок и целостных вирионов идентичны по расположению максимумов и относительным интенсивностям почти для всех полос. Исключение составила лишь уже упоминавшаяся полоса 1300 см⁻¹ белка ВТМ. Кроме того, для спектра составного образца не наблюдалось сужения полос фосфат 1 и фосфат 2, отмеченного при переходе от свободной к связанной в капсиде РНК ВКГ.

В результате исследований, проведенных при разных влажностях препаратов, выявилось существенно неодинаковое поведение разных полос ИКП. Так, при разных влажностях некоторые полосы не изменяли своих параметров, другие изменяли их незначительно. Наиболее чувствительными к влажности оказались полосы 630, 696, 1120, 1405, 1540, 1652, 3065 см^{-1} и вся высокочастотная полоса белков, а также фосфат 1, фосфат 2, 1380 и 1490 см^{-1} , полосы в интервала 1600—1700, 2800—3600 см^{-1} и полосы РНК. Изменения влажности приводили к перераспределению интенсивностей, увеличению полуширин и смещению частот колебаний.

В отличие от этого изменения температуры в интервале 310—80 К не приводили к заметным изменениям параметров большинства полос поглощения препаратов вирионов. Показательным является факт неизменности при понижении температуры полуширины основных полос и компонентов расщеплений сложных полос поглощения, так что не происходило и заметного проявления их структуры. Это, очевидно, указывает на неоднородный характер уширения колебательных полос биополимеров, о чем упоминалось нами ранее. Исключения составляют полосы С—С-колебаний ВТМ с частотами 870 и 945 см^{-1} , полуширины которых с 30 и 25 см^{-1} сужались до 25 и 18 см^{-1} в результате понижения температуры с 300 до 80 К. Как отмечалось ранее, эти же колебания были чувствительными к образованию вириона из белка и РНК. Кроме того, в триплете С—Н-валентных колебаний происходило смещение частот максимумов и перераспределение интенсивностей. При снижении температуры до 80 К максимум полосы 2880 см^{-1} смещался на 2885 см^{-1} , 2945 на 2940 см^{-1} , а 2965 на 2972 см^{-1} . Максимальной по пиковой интенсивности при 300 К была полоса на частоте 2965 см^{-1} , а при 80 К — на 2940 см^{-1} . В целом это приводило к изменению формы спектра в интервале 2800—3000 см^{-1} .

Из проведенных исследований следует, что вследствие наличия большого числа перекрывающихся сложных полос, отвечающих многочисленной и разнообразной совокупности атомных групп, достаточно строгая интерпретация спектров ИКП гетерогенных комплексов биополимеров представляет собой весьма трудную проблему и должна осуществляться лишь с привлечением данных по спектрам составляющих биохимических компонентов. Спектры рибонуклеопротеидов вирусной (и, очевидно, любой другой) природы хорошо описываются суперпозицией спектров белков и нуклеиновых кислот в эквимольярных соотношениях. Характерной особенностью является существенная зависимость параметров полос ИКП от влажности, что предъявляет соответствующие требования к условиям исследований при количественном анализе. Заметные различия в спектрах ИКП вирусных нуклеопротеидов различного типа симметрии позволяют использовать ИК-спектроскопию для экспресс-анализа их физико-химической организации.

Автор глубоко признателен С. А. Ромашову и О. И. Ильченко за помощь в подготовке образцов.

Резюме

Досліджено спектри ІЧ-поглинання білків, РНК і віріонів спірального (вірус тютюнової мозаїки) та сферичного (вірус крапчатості гвоздики) типів симетрії. Виявлено, що характеристики спектрів, такі як загальне число смуг, їх групування у частотні інтервали, наявність характерних по інтенсивності, напівширині та частоті смуг (амід А, амід В, амід 1, амід 2, фосфат 1, фосфат 2 та ін.), досить близькі як для суцільних вірусних нуклеопротеїдів, так і для їх біохімічних компонентів. Поряд з цим спостерігаються і вірогідні розходження, по яких можливо диференціювати між собою і віріони, і біополімери, що містяться в них. Відзначено зміни у параметрах смуг досліджених спектрів при змінах вологості та їх незмінність при зниженні температури від 310 до 80 К.

Summary

IR absorption spectra of proteins, ribonucleic acids and virions of spiral (tobacco mosaic virus) and spheric (carnation mottle virus) types were investigated. Such spectral parameters as total number of bands, their frequency grouping, intensity, half width and frequency characteristics of Amide A, Amide B, Amide 1, Amide 2, Phosphate 1, Phosphate 2 etc. are close enough both for the whole viral nucleoproteins and for their biochemical components. Together with this, convincing differences are observed. Thus, it is possible to differentiate virions and their constituent biopolymers after their IR spectra. Changes in parameters of the investigated spectra with humidity were found, as well as the stability with temperature decrease to 80 K.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carey P. R.* Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopies.— New York; London: Acad. press, 1982.— 272 p.
2. *Parker F. S.* Applications of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry.— New York; London: Plenum press, 1983.— 550 p.
3. *Parker F. S.* Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine.— New York: Plenum press, 1971.— 425 p.
4. *Infrared* absorption spectra of viruses / *M. Pollard, F. B. Engley, R. F. Redmond et al.* // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*— 1952.— 81, N 1.— P. 10—11.
5. *Benedict A. A.* Group classification of virus preparations by infrared spectroscopy // *J. Bacteriol.*— 1955.— 69, N 3.— P. 264—269.
6. *Ше Мидон, Чиргадзе Ю. Н., Тихоненко Т. И.* Исследование гидратации свободной и внутрифаговой ДНК методом инфракрасной спектроскопии // *Вопр. вирусологии.*— 1970.— № 5.— С. 619—622.
7. *New possibilities of investigating nucleic acids and nucleoproteins in aqueous solutions by infrared spectroscopy* / *S. Shie, L. G. Kharitononkov, T. I. Tikhonenko, Yu. M. Chirgadze* // *Nature.*— 1972.— 235.— P. 386—388.
8. *Энгельгард В. Э.* Интегрализм — путь от простого к сложному // *Известия АН СССР. Сер. биол.*— 1970.— № 6.— С. 799—822.
9. *Френкель-Конрат Х.* Химия и биология вирусов.— М.: Мир, 1972.— 336 с.
10. *Gibbs A., Harrison B.* Plant virology. The principles.— London: Edward Arnold, 1976.— 429 p.
11. *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.
12. *Практикум по общей вирусологии* / Под ред. И. Г. Атабекова.— М.: Изд-во МГУ, 1981.— 192 с.
13. *Steele K. P., Frist R. H.* Characterization of the 3' termini of the RNW's of cowpea mosaic virus // *J. Virology.*— 1978.— 26, N 2.— P. 243—248.
14. *Сузи Г.* Инфракрасные спектры биологических молекул и модельных соединений // *Структура и стабильность биологических макромолекул.*— М.: Мир, 1973.— С. 481—578.
15. *Шульц Г., Штирмер Р.* Принципы структурной организации белков.— М.: Мир, 1982.— 354 с.
16. *Mathews R. E. F.* Plant virology.— New York; London: Acad. press, 1970.— 602 p.
17. *Tremaine J. H.* Physical, chemical and serological studies on carnation mottle virus // *Virology.*— 1970.— 42, N 3.— P. 611—620.
18. *ИК спектроскопия кристаллов с водородными связями* / *Л. М. Бабков, Г. А. Пучковская, С. П. Макаренко, Т. А. Гаврилко.*— Киев: Наук. думка, 1989.— 160 с.
19. *Lehninger A. L.* Principles of biochemistry.— New York: Worth publ., 1982.— 752 p.
20. *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.
21. *Litvinov G. S., Dvobeshko G. I., Strouk V. I.* Infrared absorption peculiarities of the biological systems on different organization levels / *Recent develop. in mol. spectrosc.* / Eds B. Jordanov et al.— Singapore etc.: World Sci., 1989.— P. 674—686.

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

Получено 15.04.91