

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀԱՄԱՐՁՈՒՄՅԱՆ ԼԻԼԻԹ ԱՐՄԵՆԻ

ԳՆԹ-Ի ՀԵՏ ՄԵԹԻԼԵՆ ԿԱՊՈՒՅՏԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.02 - Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2015

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АМБАРЦУМЯН ЛИЛИТ АРМЕНОВНА

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕТИЛЕНОВОГО  
СИНЕГО С ДНК

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.02 - Биофизика

ЕРЕВАН 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գլխավորական ղեկավար՝	Կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Պ.Հ. Վարդևանյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	Կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Հ.Ռ. Վարդապետյան Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, դոցենտ Ե.Շ. Մամասախլիսով
Առաջատար կազմակերպություն՝	ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսա- բանության ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2015թ. դեկտեմբերի 4-ին ժամը 14<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՒՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 Մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2015թ. նոյեմբերի 3-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ	Մ.Ա. Փարսադանյան
--	------------------

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:	доктор биол. наук, профессор П.О. Вардеванян
Официальные оппоненты:	доктор биол. наук, профессор Г.Р. Вардапетян доктор физ.-мат. наук, доцент Е.Ш. Мамасахлисов
Ведущая организация:	Институт Молекулярной биологии и НАН РА

Защита диссертации состоится 4-го декабря 2015г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 3-го ноября 2015г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,  
кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы:** В настоящее время выяснение механизмов связывания ДНК с лигандами остается одним из актуальных вопросов молекулярной биофизики. При функционировании ДНК образует различные типы комплексов с органическими и неорганическими соединениями. Необходимо отметить, что на биологические функции ДНК могут влиять вещества, проникающие извне, в том числе и лекарственные препараты.

С этой точки зрения исследования, посвященные взаимодействию низкомолекулярных веществ – лигандов с ДНК, важны и являются одной из главных задач фундаментальных и прикладных исследований, поскольку они направлены на выяснение не только молекулярных механизмов процессов, лежащих в основе функционирования ДНК, но для синтеза новых, более безвредных и эффективных препаратов (Lane & Jenkins, 2000). Среди лигандов, непосредственно связывающихся с ДНК, особую важность представляют интеркаляторы. К их числу относится и акридиновый краситель - метиленовый синий (МС). Исследования показали, что специально разработанные производные МС могут применяться в качестве ДНК-биосенсоров, например, инструментов для сайт-направленного разрыва ДНК.

Этот лиганд является фотосенсибилизатором и имеет широкое применение в медицине, особенно в фотодинамической терапии (ФДТ). Это связано с тем, что МС связывается с макромолекулами (с нуклеиновыми кислотами, белками, а также с липидами) и, поглощая энергию кванта света, переходит в фотоактивное состояние. Фотоактивированные молекулы МС взаимодействуют с молекулярным кислородом, который вследствие этого переходит в синглетное активированное состояние и вызывает повреждения в биомолекулах (Nafisi et al., 2007). На основе этих свойств МС применяется при лечении различных воспалительных процессов, а также, малярии, различных видов опухолей и т.д. Обнаружено также, что МС может угнетать жизнеспособность различных вирусов - ВИЧ, гепатитов В и С в плазме крови человека. В последнее время этот лиганд все чаще применяется также в качестве биосенсора, активной редокс молекулы для обнаружения повреждений в ДНК (Lin et al, 2015).

Тем не менее, несмотря на многочисленность литературных данных, посвященных взаимодействию МС с ДНК, особенности механизмов связывания этого лиганда с ДНК не полностью выяснены и многие вопросы все еще остаются дискуссионными и требуют дополнительной информации.

**Цель и задачи работы.** Целью диссертационной работы явилось изучение механизмов взаимодействия МС с ДНК. Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

- обеспечить большую точность регистрации данных, выводимых из спектрофотометра PVE Unicam-SP8-100 с помощью программного обеспечения в среде LabVIEW;
- методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии исследовать связывание МС с ДНК в зависимости от концентрации лиганда;
- получить значения параметров – константы (K) и числа оснований ДНК (n), соответствующих одному месту связывания МС;

- выявить способы связывания МС с ДНК при различных ионных силах раствора;
- изучить специфичность МС в связывании с ДНК с различным нуклеотидным содержанием.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

- способы связывания МС с ДНК на основании спектров поглощения и флуоресценции, в зависимости от концентрационного соотношения;
- определение значения константы связывания  $K$  и числа оснований  $n$  приходящих на одно место связывания МС с ДНК (?);
- влияние ионной силы раствора на параметры плавления комплексов МС-ДНК -  $T_m$  и  $\Delta T$ ;
- особенности связывания МС с ДНК в зависимости от ее нуклеотидного содержания.

**Научная новизна и практическое значение.** Результаты, полученные в диссертационной работе, позволяют выяснить особенности механизмов связывания МС с ДНК при различных ионных силах раствора. В частности, полученные данные указывают, что с ДНК МС связывается, по крайней мере, двумя способами, при этом, при низких концентрациях стабилизирует нативную структуру макромолекулы. Экспериментально получено, что проявление того или иного способа связывания МС с ДНК зависит от концентрационного соотношения лиганд/ДНК –  $\gamma$ . При низких значениях этого параметра МС с ДНК связывается сильным (интеркаляционным или полуинтеркаляционным) способом, при больших же значениях  $\gamma$  – слабым (электростатическим). Показано также, что проявление интеркаляционного или полуинтеркаляционного способов зависит от ионной силы раствора.

Полученные результаты могут иметь большое прикладное значение, поскольку выявляют некоторые особенности связывания лиганда с ДНК в зависимости от концентрации, а также от условий среды и структуры ДНК. Эти результаты важны и с той точки зрения, что могут быть полезными для разработки новых биосенсоров на их основе.

Экспериментальные результаты данной работы открывают новые возможности для дальнейших исследований в этой области. Полученные данные могут быть также использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, и в научных лабораториях, занимающихся исследованием по взаимодействию лигандов с ДНК.

**Апробация работы:** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах кафедры биофизики ЕГУ и на научных конференциях: International Conference “Current Problems of Chemical Physics” dedicated to the 50<sup>th</sup> anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA, Yerevan, 2012; International Conference “Physical Concepts of Nucleic-Acid Structure and Behavior”, Yerevan, 2013; The 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> Conversation, Albany (USA) 2013, 2015.

**Публикации:** По теме диссертации опубликованы 12 научных работ: 8 статей и 4 тезиса.

**Структура и объем диссертации:** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, насчитывающего 192 наименований. Диссертация изложена на 119 страницах, включает 26 рисунка и 3 таблицы.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении кратко описывается структура диссертационной работы, обсуждаются ее цель, актуальность и научное значение.

Первая глава посвящена литературному обзору существующих данных по взаимодействию различных низкомолекулярных соединений с ДНК, структуры и конформаций ДНК, ее конформационных переходов. Приведены современные представления о механизмах связывания лигандов с ДНК.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования.

В работе были использованы - ДНК тимуса теленка (т.т.) со средним GC-содержанием 42%, *Clostridium Perfringens* (Cl. perfr.) - 31%, *Micrococcus Lysodeikticus* (M. lysod.) - 72%, “Sigma” (США), БЭ “Serva” (Германия), H33258, MC - “Aldrich” (США), NaCl, Na-цитрат (с.ч.). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации использованных препаратов были определены абсорбционным методом, используя следующие коэффициенты экстинкции:  $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для ДНК т.т. и M. lysod.,  $\epsilon_{260}=7400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для ДНК Cl. perfr.,  $\epsilon_{664}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для MC,  $\epsilon_{342}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для H33258 и  $\epsilon_{480}=5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для БЭ. Исследования проводились при ионных силах раствора 0,002 и 0,02 моль/л.

*Использованные приборы.* Спектроскопические измерения проводились на спектрофотометрах UV VIS Spectrophotometer Specord 50 Analytik Jena (Германия), Unicam SP8-100 (Англия). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Австралия). Использовались кварцевые кюветы, объемом 1 и 3 мл, длиной оптического пути 1 см. Титрование растворов исследуемых образцов проводили микропипеткой объемом 10 мкл, фирмы “Hamilton” (США).

В третьей главе приведены основные результаты исследований и их обсуждение. Перед выполнением основных экспериментальных исследований было проведено преобразование аналогового сигнала спектрофотометра PYE Unicam-SP8-100 в цифровое, с программным обеспечением в среде LabVIEW. В результате модернизации повысилась точность измерения поглощения и температуры. Описаны блок схема спектрофотометра и схема включения спектрофотометра к компьютеру. В результате модернизации расширился круг экспериментальных задач, решаемых на спектрофотометре, за счет разработки соответствующего программного обеспечения, что позволило аналоговый сигнал на выходе спектрофотометра преобразовать в цифровой и в дальнейшем анализировать эту информацию, что еще более повысило точность измерений.

Спектроскопическое исследование комплексообразования MC с ДНК. Одной из особенностью MC является то, что этот лиганд поглощает свет в длинноволновой области ( $\lambda=664 \text{ nm}$ ) и флуоресцирует, при этом, интенсивность флуоресценции регистрируется в этой же области (от 500 до 800 nm), что можно объяснить тем, что энергия возбуждения при переходе электронов в невозбужденное стационарное состояние излучается в основном в виде света с небольшими потерями. На рис. 1 представлены спектры флуоресценции чистого MC (кривая 1) и его комплексов с ДНК (кривые 2-13).

Спектры флуоресценции получены в интервале изменения длины волны  $300 \leq \lambda \leq 750$  нм, при длине волны возбуждения 290 нм. При аналогичных исследованиях обычно возбуждение проводится при длинах волн, наиболее близких к самому длинноволновому пику испускания (Changlun et al., 2010). В частности, при возбуждении МС длиной волны, соответствующей максимуму поглощения ( $\lambda=664$  нм), пик флуоресценции регистрируется при 682 нм. Однако, при возбуждении при 290 нм, на спектре флуоресценции чистого МС, наряду с пиком при 682 нм, появляется еще один, более коротковолновый пик при 583 нм. Обычно спектры флуоресценции многоатомных органических соединений однополосные, если нет процесса эксимеризации (Лакевич, 1986.). Как правило, пики, появляющиеся при эксимеризации, сдвинуты в сторону более длинных волн по сравнению с основным пиком и имеют намного меньшую интенсивность. Более того, эксимеризация имеет место или при относительно больших концентрациях лиганда ( $C > 10^{-4}$  моль/л), или в присутствии матрицы (например, ДНК) при более низких концентрациях  $C > 10^{-5}$  моль/л).

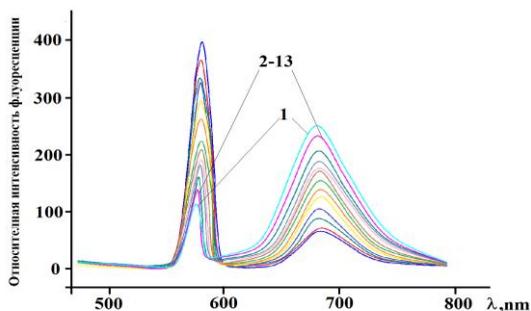


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции чистого МС (1) и МС-ДНК комплексов (2-13). Кривая 1 соответствует спектру интенсивности флуоресценции свободного МС. Кривые 2-13 соответствуют спектрам интенсивностей флуоресценции МС в комплексе с ДНК со следующими концентрациями – 3,2; 6,8; 9,6; 11,2; 12,8; 16,0; 20,8; 24,0; 32,0; 35,2; 40,0 и 48,0 мкмоль/л соответственно. Исходная концентрация МС составляла 1,6 мкмоль/л; pH=7,0,  $t=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\mu=2,0 \cdot 10^{-2}$

При выбранных нами концентрациях МС ( $\sim 10^{-6}$  М/л) димеризация или эксимеризация в отсутствие и присутствии ДНК не наблюдается (длинноволновые пики отсутствуют), следовательно, наличие двух пиков эмиссии указывает на особенности спектра флуоресценции МС. По ходу эксперимента, с увеличением концентрации ДНК, интенсивность свечения комплексов уменьшается по сравнению с интенсивностью флуоресценции МС. Это указывает на то, что с увеличением концентрации ДНК в растворе наблюдается тушение флуоресценции МС при 682 нм (Changlun et al., 2010). В указанной работе было показано, что тушение флуоресценции МС при комплексообразовании с ДНК обусловлено интеркаляцией молекул лиганда в двухцепочечную структуру макромолекулы, вследствие чего, по всей вероятности, имеет место тушение флуоресценции МС молекулами ДНК. Для

выяснения способа связывания МС с ДНК определено тушение флуоресценции МС по формуле Штерна-Волмера (см. там же):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[\text{ДНК}] \quad (1)$$

где  $F_0$  и  $F$  – интенсивности флуоресценции МС в отсутствие и присутствии тушителя ДНК,  $K_{SV}$  – константа тушения Штерна-Волмера. На рис. 2 приведена кривая зависимости  $F_0/F$  от возрастающей концентрации ДНК. Из приведенного рисунка видно, что кривая  $F_0/F$  проявляет линейную зависимость от возрастающей концентрации ДНК, при этом, константа тушения -  $K_{SV}=4.2 \cdot 10^4$  моль<sup>-1</sup>. Это является следствием того, что при 682 нм имеет место уменьшение интенсивностей комплексов по сравнению с аналогичной величиной МС. Несмотря на то, что этот результат находится в хорошем соответствии с литературными данными, тем не менее, тушение флуоресценции МС молекулами ДНК при 682 нм может быть только результатом того, что при больших соотношениях МС/ДНК вклад электростатического способа связывания значителен, что и приводит к тушению флуоресценции. В то же время, при 583 нм имеет место увеличение интенсивности флуоресценции МС при увеличении концентрации ДНК в растворе, что является следствием проявления интеркаляционного механизма связывания. На основании этих результатов мы допускаем, что наиболее вероятный механизм связывания – неполная интеркаляция молекул МС в ДНК.

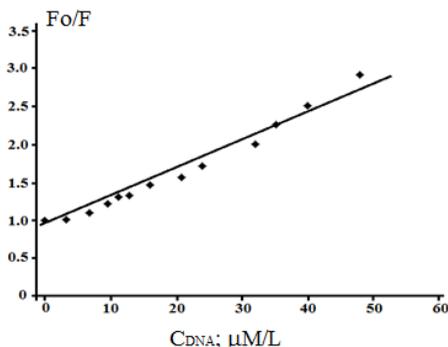


Рис. 2. Кривая зависимости тушения флуоресценции МС молекулами ДНК. Концентрация МС - 1.6 мкмоль/л; рН=7.0, t=25<sup>0</sup>С, μ=2.0·10<sup>-2</sup>М/Л.

Комплексообразование МС с ДНК было исследовано также абсорбционным методом. На рис. 3 приведены спектры поглощения МС с ДНК. Как видно из приведенного рисунка, на спектрах поглощения МС в видимой области света имеет место максимум поглощения при 664 нм, с плечом при ~620 нм (кривая 1). По мере увеличения концентрации ДНК поглощение МС уменьшается (гипохромный эффект). При этом, при относительно больших значениях  $\gamma$  ( $\gamma \geq 0.2$ ) в основном проявляется гипохромный эффект, в то время как сдвиг  $\lambda_{\text{max}}$  практически не обнаруживается. При увеличении концентрации ДНК ( $\gamma < 0.2$ ) наряду с гипохромным эффектом проявляется также длинноволновый

сдвиг ( $\sim 5$ -6нм). Известно, что красный сдвиг и гипохромный эффект обычно наблюдаются на спектрах поглощения низкомолекулярных веществ, если они интеркалируют в ДНК. При увеличении концентрации ДНК, по мере связывания МС с ней, при относительно больших значениях  $\gamma$  наблюдается гипохромный эффект без заметного сдвига  $\lambda_{\text{max}}$ , что указывает на то, что в этих условиях интеркаляция практически отсутствует. В работе (Vardevanyan, et al., 2003) показано, что спектры поглощения при полной интеркаляции лигандов в ДНК, имеющих систему ароматических колец, в частности, бромистого этидия (БЭ), сдвигаются в сторону длинных волн по сравнению со спектрами чистых лигандов примерно на 40-50 нм. С другой стороны, там же показано, что в случае комплексообразования БЭ с одноцепочечной (оц) ДНК имеет место неполная интеркаляция (полуинтеркаляция), при которой сдвиг в длинноволновую область спектров поглощения намного меньше, чем при полной интеркаляции. Ранее было установлено, что БЭ с ДНК может связываться несколькими способами, что отражается на спектральных характеристиках комплексов этого лиганда с ДНК. Так, в этой же работе, на основании спектров флуоресценции и абсорбции комплексов ДНК-БЭ получены кривые связывания в координатах Скетчарда, которые различались.

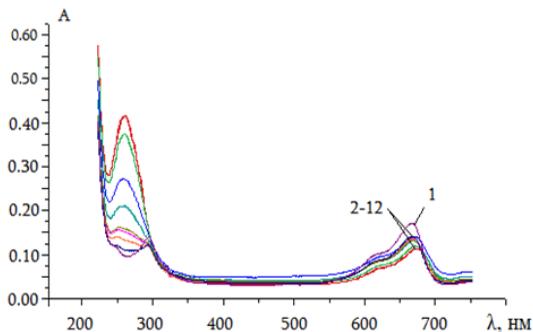


Рис. 3. Спектры поглощения свободного МС (1) и МС-ДНК комплексов (2-12) в интервале изменения  $\gamma$  -  $0 \leq \gamma \leq 1,0$  при pH=7,0,  $t=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}$  моль/л.

Этот факт обусловлен присутствием нефлуоресцирующих молекул БЭ на ДНК, которые регистрируются только абсорбционным методом. Из кривых связывания были определены значения  $K$  и  $n$  для трех способов связывания БЭ с ДНК и, на основании полученных данных было показано, что в условиях эксперимента при  $\mu=2.0 \cdot 10^{-2}$  моль/л с ДНК БЭ взаимодействует по крайней мере тремя способами – интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим.

Аналогичным образом, на основании спектров флуоресценции и абсорбции получены кривые связывания МС с ДНК в координатах Скетчарда - зависимость  $\gamma/C_f$  от  $\gamma$ , где  $C_f$  - концентрация несвязанных молекул лиганда в растворе. Кривые связывания МС с ДНК приведены на рис. 4. Необходимо отметить, что экспериментальные точки, полученные из анализа спектров флуоресценции и абсорбции комплексов МС-ДНК, совпадали друг с другом,

поэтому приводится обобщенная кривая. Изотерма при низких значениях  $r$  имела прямолинейный ход вплоть до значений  $r=0,14$ , а при  $r>0,14$  на кривой зависимости  $r/C_r$  от  $r$  появлялся излом. При этом, по мере возрастания значений  $r$  на кривой связывания появляется второй прямолинейный участок, как это видно из приведенного рисунка. Наличие четко выраженных двух прямолинейных участков на кривой указывает на существование, по крайней мере, двух способов связывания МС с ДНК. Более того, один из них сильный и характеризуется константой связывания лиганда с ДНК  $\sim 6.5 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}$  и числом оснований, соответствующих одному месту связывания -  $\sim 4$ . Вторым, более слабым, с константой связывания  $\sim 1.5 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}$  и числом оснований, соответствующих одному месту связывания -  $\sim 2$ .

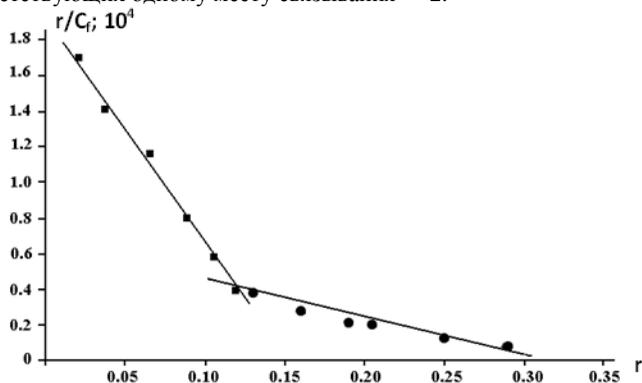


Рис. 4. Кривая связывания МС с ДНК в координатах Скетчарда, полученная из спектров флуоресценции и поглощения (рис. 1 и 2) при  $pH=7,0$ ,  $t=25$  °С,  $\mu=2 \cdot 10^{-2}$  моль/л.

Таким образом, полученные результаты выявляют, что способы связывания МС с ДНК зависят от молярного соотношения  $r$ . При больших значениях  $r$  положительно заряженные молекулы МС в основном связываются с фосфатными группами ДНК электростатическим способом, вследствие чего интенсивность флуоресценции уменьшается, а на спектрах поглощения наблюдается гипохромный эффект. При низких значениях  $r$  начинает проявляться второй способ, соответствующий полунтеркаляционному, при котором молекулы МС вклиниваются в пространство между двумя соседствующими основаниями одной из нитей ДНК.

Плавление комплексов МС с ДНК. Для установления способов связывания МС с ДНК и выявления условий, необходимых для проявления того или иного способа, нами проводилось плавление их комплексов при ионных силах раствора 0.002 и 0.02 моль/л. На рис. 5 приведены кривые плавления ДНК (кривая 1) и ее комплексов с МС (кривые 2 и 3) при ионной силе 0.02 моль/л (аналогичные кривые получены при 0.002 моль/л поэтому не приводятся?). Как видно из приведенного рисунка, кривые плавления комплексов сдвигаются в сторону высоких температур по сравнению с таковой, полученной для чистой ДНК. Это указывает на то, что этот лиганд предпочтительнее связывается с двухцепочечной (дц) ДНК и стабилизирует ее

структуру, при этом, этот эффект обнаруживается в интервале изменения  $0 < t \leq 0,33$ . Из этих кривых определены значения температуры ( $T_m$ ) и ширины интервала плавления -  $\Delta T$  ДНК и комплексов МС-ДНК. Из полученных данных выявляется, что с увеличением концентрации лиганда  $T_m$  возрастает. Возрастает также значения  $\Delta T$  при низких концентрациях лиганда, однако, при дальнейшем увеличении концентрации последнего, значения  $\Delta T$  претерпевают незначительные изменения. Из параметров плавления рассчитаны изменения  $T_m$  и  $\Delta T$  -  $\delta T_m$  ( $\delta T_m = T_m^k - T_m^0$ , где  $T_m^k$  - температура плавления комплексов МС-ДНК,  $T_m^0$  - аналогичный параметр ДНК) и  $\delta \Delta T$  ( $\delta \Delta T = \Delta T^k - \Delta T^0$ ,  $\Delta T^k$  - ширина интервала плавления комплексов,  $\Delta T^0$  - аналогичный параметр ДНК). На рис. 6 приведены кривые зависимостей  $\delta T_m$  комплексов ДНК-МС при ионных силах 0,02 и 0,002 моль/л. Как видно из приведенного рисунка, эти кривые монотонно возрастают с увеличением концентрации лиганда.

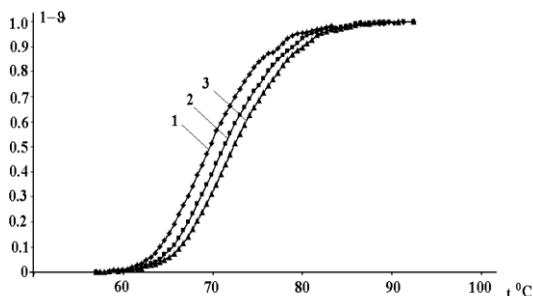


Рис. 5. Кривые плавления ДНК (1) и ее комплексов с МС (кривые 2 и 3) при значениях  $\gamma$  - 0,1 и 0,167 соответственно. Ионная сила раствора 0,02 моль/л,  $pH \approx 7,0$ .

Этот факт указывает на то, что МС предпочтительнее связывается с нативной формой ДНК и увеличивает ее стабильность по отношению к дестабилизирующему фактору. При этом, этот эффект более выражен при низких ионных силах раствора, поскольку при 0,002 моль/л изменение температуры плавления существенно больше (кривая 1), чем при 0,02 моль/л  $Na^+$ . Мы полагаем, что, это обусловлено тем, что при низких ионных силах раствора МС связывается с ДНК также интеркаляционным способом, поскольку в этих условиях молекулы лиганда переходят из полярного водного окружения в плоскость между парами оснований ДНК, которая является неполярной гидрофобной средой. Эти данные находятся в соответствии с результатами работы (Rohs R., 2004.), где показано, что при низких ионных силах основным способом связывания МС является интеркаляция. Наряду с интеркаляцией, молекулы МС могут также связываться с ДНК электростатически, поскольку при низких ионных силах раствора ионы  $Na^+$  меньше экранируют отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК от положительно заряженных молекул МС, чем при высоких ионных силах.

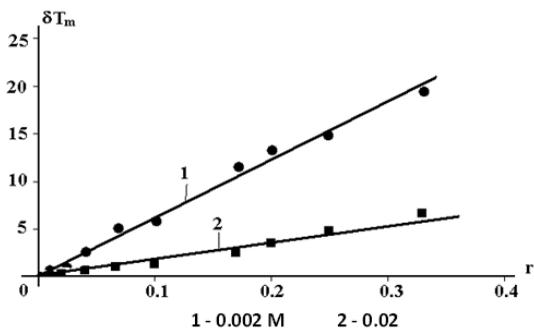


Рис. 6. Зависимость изменения температуры  $\delta T_m$  комплексов МС с ДНК от  $r$ . Кривая 1 получена при ионной силе раствора 0,002 моль/л, кривая 2 – при 0,02 моль/л.

Предпочтительность проявления интеркаляционного механизма при низких ионных силах раствора обусловлена и тем, что в этих условиях спираль ДНК находится в менее закрученном состоянии и переход молекул лиганда в плоскость между двумя парами оснований облегчен. В противоположность этому, при 0,02 моль/л для интеркаляции необходима дополнительная энергия для раскручивания спирали ДНК и расхождения соседних пар оснований вдоль ее молекулы, что при низких температурах раствора термодинамически невыгодно. Следовательно, в этих условиях молекулы лиганда взаимодействуют с ДНК другими способами (электростатически и др), вследствие чего и стабилизация нативной структуры комплексов имеет место в меньшей мере, чем при ионной силе раствора 0,002 моль/л. С этой точки зрения не исключается возможность полуинтеркаляционного связывания МС с ДНК, как это показано в случае взаимодействия БЭ с ДНК. Подтверждением этого факта может служить и величина параметра  $\delta \Delta T$ . В частности, зависимость этого параметра от  $r$ , приведенная на рис. 7 и полученная при ионной силе раствора 0,002 моль/л (кривая 1), имеет колоколообразную форму, в то время как при 0,02 моль/л ход этой кривой менее крутой возрастает при низких значениях  $r$  и достигает насыщения при увеличении  $r$ . Как видно из приведенного рисунка, при низких значениях  $r$  ( $0 < r \leq 0,1$ )  $\delta \Delta T$  возрастает при обеих ионных силах. При дальнейшем увеличении концентрации МС (относительно больших значениях  $r$ )  $\delta \Delta T$  выходит на плато, причем, при ионной силе раствора 0,002 моль/л плато образуется в интервале  $0,1 < r \leq 0,25$ , а при увеличении  $r$   $\delta \Delta T$  начинает уменьшаться, в то время как при ионной силе 0,02 моль/л этот параметр практически не изменяется. Увеличение  $\delta \Delta T$  при низких значениях  $r$  обусловлено тем, что, по мере плавления комплексов, связанные молекулы МС перераспределяются с денатурированных на еще не денатурированные участки ДНК. Это приводит к образованию новых, стабилизированных участков на ДНК, вследствие чего процесс плавления в зависимости от температуры “затягивается”, то есть больше энергии затрачивается на полную денатурацию комплексов. При этом, как и в случае БЭ, более вероятным способом связывания МС с ДНК должна

являться интеркаляция. При увеличении концентрации лиганда интеркаляционные места связывания насыщаются, вследствие чего перераспределение молекул лиганда по ходу плавления затрудняется (прекращается при больших значениях  $r$ ) и  $\delta\Delta T$  в этих условиях приобретает постоянное значение.

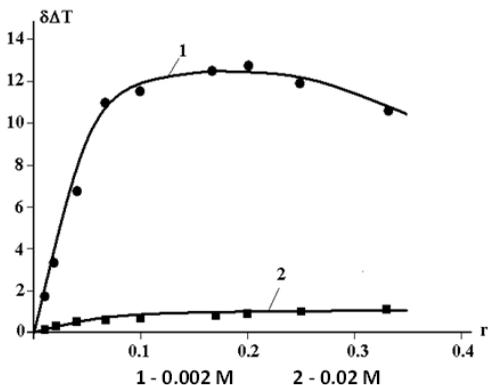


Рис. 7. Зависимость изменения температуры  $\delta\Delta T$  от  $r$  комплексов МС с ДНК от  $r$ . Кривая 1 получена при ионной силе раствора 0,002 моль/л, кривая 2 – при 0,02 моль/л.

Аналогичный ход кривой наблюдается при ионной силе раствора 0,02 моль/л. Однако, при ионной силе 0,002, и при значениях  $r > 0,25$  М (?)  $\delta\Delta T$  начинает уменьшаться, приобретая колоколообразную форму. В случае комплексообразования МС с ДНК (рис.7, кривая 1) она схожа с таковой, полученной для комплексов БЭ-ДНК, что указывают на то, что при низких концентрациях соли МС, аналогично с БЭ, может связываться с ДНК интеркаляционным способом. При этом, не исключаются также другие механизмы взаимодействия. Для большинства лигандов-интеркаляторов, в настоящее время, кроме полной интеркаляции в двойную спираль ДНК, выявлена также неполная интеркаляция (полуинтеркаляция) и этот тип интеркаляции возможен и в случае одноцепочечных (оц), и в случае двухцепочечных (дц) ДНК или полинуклеотидов. При этом, в случае дц-ДНК полуинтеркаляция возможна в обоих нитях одновременно. На основании этого мы полагаем, что, при ионной силе раствора 0,002 моль/л, в интервале изменения  $0,1 < r \leq 0,25$ , наряду с интеркаляционными, МС образует с ДНК и полуинтеркаляционные комплексы. Известно, что интервал плавления ДНК (величина  $\Delta T$ ) является мерой ее гетерогенного строения -  $\Delta T = T_{GC} - T_{AT}$  и в случае гомополинуклеотидов эта величина равняется примерно  $0,5 - 1^{\circ}\text{C}$ . Этот ненулевой интервал плавления гомополинуклеотидов обусловлен гетерогенностью стекинг взаимодействий пар оснований вдоль молекулы полинуклеотидов. По этой причине в случае природных ДНК величина  $\Delta T$  значительна (вплоть до  $13 - 15^{\circ}\text{C}$ ) (Karapetian et al, 1990.). С этой точки зрения уменьшение  $\Delta T$  (а также  $\delta\Delta T$ ) комплексов, при высоких концентрациях лиганда, может быть обусловлено только изменением гетерогенности стекинг взаимодействий (поскольку все остальные факторы, обуславливающие

ширину интервала плавления, не меняются). Исходя из этого, мы полагаем, что полуинтеркаляционный способ связывания, в противоположность интеркаляционному, вызывает уменьшение гетерогенности стекинг взаимодействий. При таком рассмотрении комплексов ДНК с МС, при высоких концентрациях лиганда, и при ионной силе раствора 0,02 моль/л зависимость  $\Delta T$  от  $g$  должна была падать. На эксперименте этого не обнаруживается. Мы полагаем, что при высоких ионных силах не все способы связывания МС с ДНК проявляются. Учитывая также более компактную структуру последней мы полагаем, что при больших ионных силах раствора более предпочтительными становятся полуинтеркаляционный и электростатический способы связывания. То обстоятельство, что зависимость  $\Delta T$ , начиная с определенных значений  $g$ , практически не меняется, мы заключаем, что в отсутствие полной интеркаляции вклад электростатического способа в стабилизацию ДНК становится существенным. В то же время известно, что величина ширины интервала плавления ДНК мало зависит от ионной силы раствора и, приобретая определенное значение, остается постоянной при увеличении концентрации соли. Поэтому, при высоких концентрациях лиганда и при относительно больших ионных силах величина  $\Delta T$  комплексов ДНК-МС остается постоянной, несмотря на то, что температура плавления при этом увеличивается.

Таким образом, на основании полученных данных мы заключаем, что МС с ДНК может связываться несколькими способами, проявление которых зависит от ионной силы раствора. В частности, при ионной силе 0,002 моль/л проявляются три способа – интеркаляционный, полуинтеркаляционный и электростатический, при ионной силе 0,02 М – два, полуинтеркаляционный и электростатический способы. Отсутствие интеркаляционного способа при ионной силе раствора 0,02 моль/л отражается и на спектрах абсорбции и флуоресценции комплексов МС с ДНК. Из приведенных данных также выявляется, что при уменьшении концентрации  $Na^+$  на порядок, по мере увеличения концентрации лиганда,  $T_m$  и  $\Delta T$  увеличиваются значительно по сравнению с таковыми, полученными при концентрации  $Na^+$  - 0,02 моль/л. Это может быть следствием того, что ДНК при указанных ионных силах раствора имеет качественно различные структуры (по всей вероятности более релаксированная при 0,002 моль/л и более компактная – при 0,02 моль/л). С этой точки зрения, МС с различными структурами ДНК связывается различными способами (механизмами), что и отражается на термодинамических параметрах.

Влияние GC-содержания на взаимодействие МС с ДНК. Взаимодействие БЭ с ДНК различного GC содержания исследовалось методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии (Vardevanyan et al, 2012) и было получено, что с увеличением GC-содержания ДНК значение  $n$  в случае полуинтеркаляционного способа уменьшается, в то время как в случае интеркаляции,  $n$  не зависит от нуклеотидной последовательности ДНК. На рис. 8 показана зависимость  $n$  от полуинтеркаляционных комплексов от среднего GC-содержания ДНК. Эта зависимость проявляет монотонное уменьшение от увеличения GC-содержания, что отражает некоторую предпочтительность БЭ к GC парам при полуинтеркаляции, поскольку экстраполяция этой

зависимости к GC=100%, значение  $n$  приближается к трем нуклеотидным парам на одно место связывания БЭ (?).

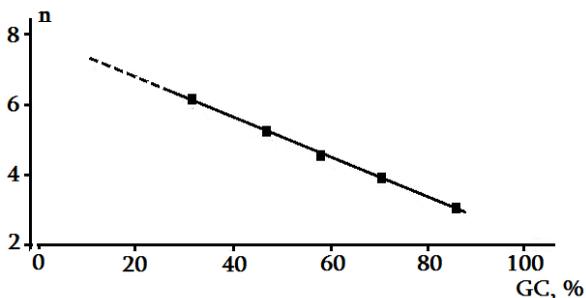


Рис 8. Кривая зависимости  $n$  полуинтеркаляционных комплексов от среднего GC содержания ДНК.

Возможным объяснением этого факта может служить то, что AT последовательности имеют более “жесткую” структуру и более гидратированы, чем GC участки (Зенгер 1987). На это указывают и результаты исследований, проведенные в работе (Vardevanyan et.al, 2000), где показано, что интеркаляция БЭ в poly(dA)-poly(dT) является кооперативным процессом, в то время как в случае природных ДНК процесс интеркаляции некооперативный. Очевидно, что структурная жесткость и высокая степень гидратированности могут ограничить число мест связывания БЭ в AT богатых участках. Литературные данные указывают на то, что механизмы связывания МС с ДНК зависят от последовательностей нуклеотидных пар ДНК: с AT последовательностями этот лиганд взаимодействует как желобково связывающиеся лиганды (нетропсин, Hoechst 33258 и др), с GC последовательностями – как интеркалятор. При этом, интеркаляционный способ проявляется при низких ионных силах раствора, в то время как желобковое связывание с ярко выраженной AT специфичностью практически не зависит от ионной силы раствора.

Полученные нами данные по плавлению комплексов ДНК-МС подтверждают выводы об интеркаляционном способе связывания МС с ДНК при низких ионных силах раствора. В то же время, результаты, полученные нами при относительно больших концентрациях соли, не выявили AT специфического связывания. В частности, ход кривой 2 зависимости  $\Delta T$  от  $\gamma$  на рис. 7 нельзя объяснить с точки зрения специфичности МС к AT последовательностям ДНК, поскольку в этом случае эта зависимость должна была уменьшаться, приобретая отрицательные значения, как это получено в случае связывания Н33258 с ДНК. Н33258 является типичным представителем специфически связывающихся с ДНК лигандов, локализирующийся в малой бороздке ДНК, образуя связи с AT последовательностями последней. Ранее было показано, что изменение ширины интервала плавления комплексов ДНК-Н33258 -  $\Delta T$  при ионной силе раствора 0,02 моль/л с увеличением  $\gamma$  уменьшается, приобретая отрицательные значения (Vardevanyan et. al, 2008).

Отрицательное уменьшение зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r$  является следствием АТ специфичности, поскольку связываясь с этими последовательностями, НЗ3258 повышает их температуру плавления, в то время как температура плавления GC последовательностей практически остается неизменной. Исходя из этого, становится очевидным, что при неизменном значении  $T_{GC}$  и возрастании  $T_{AT}$   $\Delta T$  уменьшится, вследствие чего  $\delta\Delta T$  станет отрицательным. Исходя из этого, нами, методом плавления исследовались комплексы МС с ДНК с различным GC содержанием.

На рис. 9 приведены зависимости изменения ширины интервала плавления -  $\delta\Delta T$  комплексов МС-ДНК при ионной силе раствора 0,02 моль/л. Как видно из приведенного рисунка, изменение ширины интервала плавления комплексов МС с ДНК Cl. Perfr. (кривая 1) меньше, чем в случае ДНК тимуса телянка и M. Lysod. С другой стороны, значения  $\delta\Delta T$  во всех случаях положительны, что указывает на то, что этот лиганд не проявляет ярко выраженную АТ специфичность, как Hoechst 33258. В то же время, как видно из приведенного рисунка, в случае ДНК M. Lysod. имеет место наибольшее увеличение значений  $\delta\Delta T$ , что, по всей вероятности, обусловлено предпочтительным связыванием МС с GC богатыми участками ДНК.

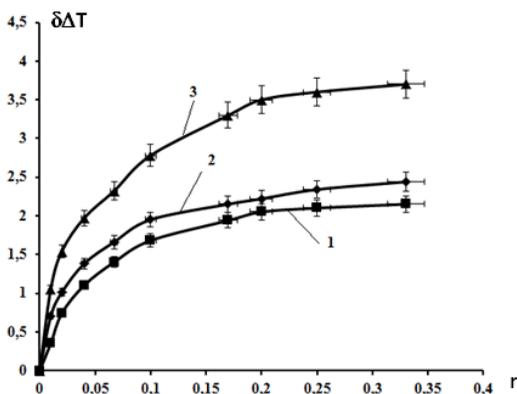


Рис. 9. Зависимость изменения ширины интервала плавления  $\delta\Delta T$  от  $r$  комплексов МС с ДНК различного GC содержания - Cl. Perfr. (31 %) (1), тимуса телянка (42 %) (кривая 2) и M. Lysod. (72 %) (кривая 3) при ионной силе раствора 0,02 моль/л.

Аналогичные исследования проводились и в случае взаимодействия БЭ с ДНК (кривые не приводятся). Полученные кривые зависимости  $\delta\Delta T$  от  $r$  комплексов БЭ-ДНК при ионной силе раствора 0,02 моль/л имеют колоколообразную форму. Примечательным является то, что при низких концентрациях БЭ ( $0 < r \leq 0,1$ ) зависимость  $\delta\Delta T$  возрастает, при этом кривые, соответствующие комплексам БЭ с ДНК Cl. Perfr., Calf thymus и M. Lysod., практически ложатся друг на друга. В этом интервале изменения  $r$  основным способом связывания БЭ с ДНК является интеркаляция. При увеличении  $r$

(>0,1) кривые зависимости  $\delta\Delta T$  от этого параметра в случае комплексов БЭ с ДНК уменьшаются и начинают расходиться, что указывает на то, что и в случае полуинтеркаляции БЭ в ДНК также проявляется определенная предпочтительность к GC последовательностям, поскольку  $\delta\Delta T$  наибольшее значение имеет в случае ДНК M. Liysod.

Зависимость полуинтеркаляции лигандов от GC содержания ДНК обусловлена тем, что гидратная оболочка этих последовательностей менее плотная по сравнению с AT кластерами, в которых образуются жесткие водные мостики. Обычно, в участках с GC последовательностями связанные молекулы воды образуют более рыхлую оболочку, чем в AT богатых участках, где образуется высокоупорядоченный водный мостик противоположенными нитями ДНК. Этот водный “хребет” в малой бороздке сшивает ее края, которая, тем самым, становится менее доступной для интеркаляции молекул лиганда (Зенгер, 1987).

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что при интеркаляции в ДНК МС (как и БЭ) не проявляет специфичность к определенным нуклеотидным последовательностям, в то время как при полуинтеркаляционном способе, GC содержание играет важную роль при насыщении лигандом этих мест связывания. С другой стороны, по аналогии с БЭ не обнаруживается специфичность к AT богатым участкам.

#### Заключение

В работе исследовано взаимодействие метиленового синего (МС) с ДНК. Полученные данные выявили, что этот лиганд может связываться с ней несколькими способами, при этом, способы его связывания с ДНК зависят от молярного соотношения г. При относительно больших значениях г, основным способом является электростатическое взаимодействие.

При уменьшении г предпочтительным способом связывания становится полуинтеркаляция – молекулы МС встраиваются в пространство между двумя соседствующими основаниями в одной из нитей ДНК. На основании Скотчард анализа экспериментальных данных построена кривая связывания МС с ДНК и выявлено, что эта кривая состоит из двух прямолинейных участков, что указывает на два типа взаимодействия, для которых определены значения констант К и числа мест n связывания этого лиганда с ДНК.

Также выявлено, что этот лиганд проявляет специфичность к GC парам ДНК. С другой стороны, полученные нами данные свидетельствуют в пользу нескольких способов связывания МС с ДНК при низких ионных силах раствора – интеркаляционного, полуинтеркаляционного, электростатического. При более высоких ионных силах раствора не все способы связывания этого лиганда могут проявляться, в частности, полная интеркаляция становится термодинамически невыгодной.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что способ связывания МС с ДНК зависит от молярного соотношения [лиганд]/[ДНК] ( $r$ ). При значениях  $r \geq 0,25$ , наблюдается гипохромный эффект на спектрах поглощения МС и уменьшение интенсивности флуоресценции при 682 нм на спектрах флуоресценции.
2. При  $r < 0,25$ , наряду с гипохромным эффектом, наблюдается красный сдвиг на спектрах поглощения и увеличение интенсивности флуоресценции при 583 нм на спектрах флуоресценции.
3. При ионной силе раствора 0,002 М МС (как и в случае БЭ) с ДНК связывается по крайней мере тремя способами – интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим.
4. При ионной силе раствора 0,02 моль/л интеркаляция не проявляется и МС с ДНК связывается двумя способами – полуинтеркаляционным и электростатическим, в то время как в случае БЭ все три способа проявляются.
5. Определены значения констант ( $K$ ) и числа оснований ( $n$ ), приходящих на одно место связывания МС с ДНК для двух способов при ионной силе раствора 0,02 моль/л. Значения обоих параметров отличаются друг от друга: один из них соответствует сильному способу с ограниченным числом мест связывания, другой – слабому с большим числом мест посадки.
6. При полуинтеркаляционном способе связывания, МС, как и БЭ, проявляет специфичность к GC богатым участкам, в то время как к AT богатым участкам такая специфичность не обнаруживается и не зависит от ионной силы раствора.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Torosyan M.A. and Karapetian A.T., The Influence of GC/AT Composition on Intercalating and Semi-Intercalating Binding of Ethidium Bromide to DNA. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, V. 23, N11, p. 2016-2020.
2. Tavadyan L.A., Minasyan S.H., Manukyan Z.H., Elchinyan S.A., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Hambardzumyan L.A., Vardevanyan P.O., Interactions of ds-DNA with intercalating drugs by differential pulse voltammetry and spectroscopy. International Conference “Current Problems of Chemical Physics” dedicated to the 50<sup>th</sup> anniversary of the Institute of Chemical Physics NAS RA. 9-12 Oct., Yerevan, Book of Abstracts. 2012, p. 200-201.
3. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Шагинян М.А., Амбарцумян Л.А., Исследование связывания метиленового синего с ДНК спектроскопическими методами. *ДАН РА*, т. 113, N2, 2013, с. 180-188.
4. Hambardzumyan L.A., Thermodynamic investigation of methylene blue complexes with DNA. *YSU Sci. Reports*, 1, 2013, p. 23-27.
5. Элбакян В.Л., Саакян Н.С., Шагинян М.А., Антонян А.П., Амбарцумян Л.А., Вардеванян П.О., Модернизация спектрофотометра и программное обеспечение для кинетических и спектрофотометрических исследований, разработанное в среде LabVIEW. *Вестник инженерной академии Армении*. т. IX, N4, 2012, с. 848-853.
6. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Mechanisms for binding between methylene blue and DNA. *J. Appl. Spectrosc.*, v. 80, N4, 2013, p. 595-599.
7. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Shahinyan M.A., Karapetian A.T., Thermodynamic analysis of DNA complexes with methylene blue, ethidium bromide and Hoechst 33258. *Biopolym.Cell*, v.29, N6, 2013, p. 515-520.
8. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Antonyan A.P., Mukhaelyan Zh.H., Hambardzumyan L.A., Karapetian A.T., Novel interpretation of the isotherms of multimodal ligands binding with DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 31, Supplement, Book of Abstracts. Albany 2013: The 18th Conversation 2013, p. 58.
9. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Minasyants M.V., Karapetian A.T., Spectroscopic investigation of methylene blue binding to DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 31, Supplement, Book of Abstracts. Albany 2013: The 18th Conversation 2013, p. 59.
10. Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Vardevanyan P.O. // Analysis of fluorescence spectra of complexes of methylene blue with DNA. *Biolog. Journal of Armenia*, V. 67, N1, 2015, p. 35-39.
11. Antonyan A.P., Hambardzumyan L.A., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. The binding mechanisms of methylene blue with DNA. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, Albany 2015: The 19th Convers., June 9-13, p. 83.
12. Hambardzumyan L.A. Effect of DNA GC-content on the interaction with methylene blue. *Proceedings of YSU*, 2015, N1, p. 45-49.

ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ ԼԻԼԻԹ ԱՐՄԵՆԻ

ԴՆԹ-ի ՀԵՏ ՄԵԹԻԼԵՆ ԿԱՊՈՒՅՏԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. ԴՆԹ, մեթիլեն կապույտ, ԴՆԹ-լիզանդ կոմպլեքսներ, կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրներ, կապման կորեր, հալման կորեր

Աշխատանքում ուսումնասիրվել են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունները և ստացված տվյալները համեմատվել են ԷԲ-ի, ինչպես նաև Hoechst 33258-ի համար ստացված տվյալների հետ: Փորձարարական հետազոտությունների ճշգրտության մեծացման նպատակով իրականացվել է PYE Unicam-SP8-100 սպեկտրաֆոտոմետրի անալոգային ազդանշանի վերափոխում թվայինի՝ LabVIEW միջավայրում ծրագրային ապահովմամբ:

Նկարագրվել են սպեկտրաֆոտոմետրի տարբեր համակարգերի կառուցվածքային, ինչպես նաև համակարգչի հետ սպեկտրաֆոտոմետրի միացման գծապատկերները: Սպեկտրաֆոտոմետրի անալոգային ազդանշանի՝ թվայինի վերափոխման արդյունքում ընդլայնվել են փորձարարական խնդիրների շրջանակները, քանի որ դա հնարավորություն է ընձեռում վերլուծելու այդ տեղեկատվությունը:

Աշխատանքում ուսումնասիրվել են ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի փոխազդեցության առանձնահատկությունները կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդներով, և բացահայտվել է, որ, ինչպես և ԷԲ-ն, այդ լիզանդը ԴՆԹ-ի հետ նույնպես կապվում է մի քանի եղանակներով, ընդ որում, կապման եղանակները կախված են r-ից, (r-ը լիզանդ/ԴՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունն է):

r-ի հարաբերականորեն մեծ արժեքների դեպքում տեղի է ունենում կոմպլեքսների կլանման նվազում, ընդ որում, դրանց ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը ևս նվազում է, ինչը վկայում է ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի էլեկտրաստատիկ եղանակով կապման մասին: ԴՆԹ-ի ավելի մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում ՄԿ-ը կապվում է կիսահետերակայացիոն եղանակով:

ԴՆԹ-ՄԿ կոմպլեքսները ուսումնասիրվել են հալման մեթոդով 0,002 և 0,02 մոլ/լ իոնական ուժերում: Ստացված տվյալները վկայում են, որ այս լիզանդը ԴՆԹ-ի երկշղթա կառուցվածքի վրա ունի չափավոր կայունացնող ազդեցություն, քանի որ կոմպլեքսների հալման ջերմաստիճանն աճում է ԴՆԹ-ի համապատասխան բնութագրի համեմատ՝ լիզանդի կոնցենտրացիան մեծացնելիս: ԴՆԹ-ի հետ ՄԿ-ի կոմպլեքսների համար

ստացված տվյալների համեմատությունը ԴՆԹ-ԷԲ կոմպլեքսների դեպքում ստացված տվյալների հետ թույլ է տվել բացահայտելու, որ 0,02 մոլ իոնական ուժում ՄԿ-ը ԴՆԹ-ի հետ կապվում է երկու կիսահինտերկայացիոն և էլեկտրաստատիկ, 0,002 մոլ/լ իոնական ուժում՝ երեք՝ ինտերկայացիոն, կիսահինտերկայացիոն և էլեկտրաստատիկ եղանակներով:

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է նաև ՄԿ-ի խնամակցությունը ԴՆԹ-ի տարբեր տիպի հաջորդականությունների նկատմամբ և բացահայտվել է, որ, ինչպես և ԷԲ-ը, այս լիզանդը որոշակի խնամակցություն ցուցաբերում է ԴՆԹ-ի GC հարուստ տեղամասերի նկատմամբ՝ կիսահինտերկայացիոն եղանակով փոխազդելիս: ԷԲ-ի դեպքում ևս հայտնաբերվել է խնամակցություն GC հարուստ հաջորդականությունների նկատմամբ՝ կիսահինտերկայացիոն եղանակով փոխազդելիս, մինչդեռ H33258-ը լուծույթի մեծ իոնական ուժերում ցուցաբերում է խնամակցություն AT հաջորդականությունների նկատմամբ:

PECULIARITIES OF METHYLENE BLUE INTERACTION WITH DNA

SUMMARY

Key words: DNA, methylene blue, DNA-ligand complexes, absorption and fluorescent spectra, binding curves, melting curves

In this work the interaction peculiarities of methylene blue with DNA have been studied and the obtained data were compared to those of EtBr as well as Hoechst 33258. To enhance precision of experimental investigations a transformation of PYE Unicam-SP8-100 spectrophotometer analogous signal to digital one was realized with program providing in LabVIEW medium.

The structural schemes of different systems of spectrophotometer as well as its connection to computer were described. As a result of spectrophotometer analogous signal transformation to digital one the framework of experimental tasks was widened because it makes possible to analyze that information.

In this work the interaction of MB with DNA was investigated by absorption and fluorescence spectroscopy methods and it was revealed that as EtBr this ligand also binds to DNA by several modes, moreover, binding modes depend on  $r$  ( $r$ =ligand/DNA concentration ratio). In the case of relatively high values of  $r$  absorption decrease of complexes takes place, moreover, their fluorescence intensity decreases as well which indicates an electrostatic binding mode of MB with DNA. In the case of DNA higher concentrations MB binds by semi-intercalation mode.

DNA-MB complexes were studied by melting method at 0.002 and 0.02 M/l ionic strengths. The obtained data indicate that this ligand has a moderate stabilizing effect on DNA double-stranded structure, since the melting temperature of complexes increases compared to DNA corresponding characteristic at ligand concentration enhancement. The comparison of obtained data for EtBr-DNA complexes to those for DNA-MB complexes allows to reveal that at 0.02 M ionic strength MB binds to DNA by two – semi-intercalation and electrostatic modes, at

0.002 M ionic strength – three – intercalation, semi-intercalation and electrostatic modes.

In the present work MB affinity to DNA different type base pairs was studied as well and it was revealed that as EtBr, this ligand shows certain affinity to DNA GC-rich sequences when it interacts by semi-intercalation mode. In the case of EtBr it was also revealed affinity to GC- rich sequences, while H33258 shows affinity to AT-sequences at high ionic strengths.