

УДК 543.42

ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Г. П. Жижина и Э. Ф. Олейник

В обзоре обобщены данные по изучению ИК- и КР-спектров ДНК, РНК и их компонентов и отнесение полос ИК-спектров к колебаниям отдельных связей. Описан подход к теоретическому рассмотрению нормальных колебаний скелета нуклеиновых кислот. Рассматривается применение ИК-спектроскопии к изучению специфичности взаимодействия гетероциклических оснований, вторичной структуры нуклеиновых кислот и их взаимодействий с белками, ионами металлов и некоторыми биологически активными веществами.

Библиография — 218 наименований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	474
II. Колебательные спектры нуклеиновых кислот	475
III. Колебания цепи главных валентностей нуклеиновых кислот	481
IV. Колебания оснований нуклеиновых кислот	483
V. Изучение вторичной структуры нуклеиновых кислот по их ИК-спектрам	496
VI. Изучение методом ИКС взаимодействий компонентов нуклеиновых кислот между собой и с различными веществами	500

I. ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное развитие молекулярной биологии сопровождается широким использованием физических и физико-химических методов для исследования состава и строения биологически важных соединений. Все большее значение среди этих методов приобретает инфракрасная спектроскопия (ИКС).

Метод ИКС с успехом применяют для решения различных структурных и физико-химических задач молекулярной биологии, в том числе для распознавания соединений с небольшими структурными особенностями, для определения структурных формул биологически важных соединений, для изучения пространственной конфигурации биополимеров.

В настоящее время исследуются ИК-спектры таких биологически важных соединений, как аминокислоты, пептиды, гетероциклические основания нуклеиновых кислот, липиды, стероиды, витамины, а также спектры биополимеров — белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов. Большие успехи достигнуты в изучении структуры полипептидов и белков с применением теоретического анализа нормальных колебаний. Однако для нуклеиновых кислот пока отсутствует полное описание нормальных колебаний, что объясняется, вероятнее всего, сложностью структуры их молекул. Поэтому основные полосы ИК-спектров оснований, полинуклеотидов и нуклеиновых кислот интерпретированы полуэмпирическим методом на основании изучения поглощения отдельных атомных группировок в низкомолекулярных составляющих. Это снижает достоверность выводов, а главное, ограничивает информацию, которая могла бы быть получена из ИК-спектров.

Нуклеиновые кислоты, как известно, представляют собой высокополимерные неразветвленные молекулы, цепь главных валентностей кото-

рых состоит из чередующихся звеньев фосфорной кислоты и сахара; к остаткам сахара присоединены пуриновые и пиримидиновые основания (рис. 1) *. Молекулярная структура нуклеиновых кислот, а также синтетических полинуклеотидов в настоящее время достаточно хорошо изучена, как можно видеть из многочисленных статей, обзоров и монографий ¹⁻⁹.

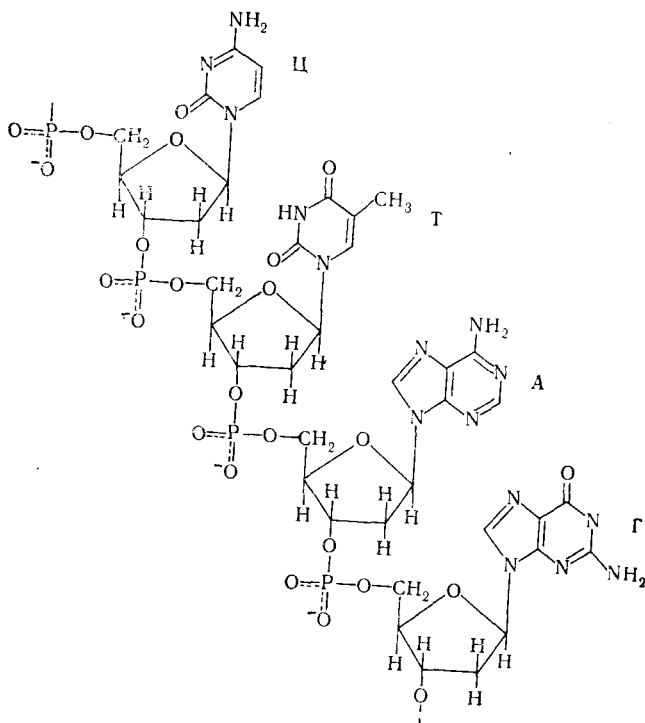


Рис. 1. Схема первичной структуры цепочки ДНК

В отечественной литературе нет обзорных работ по ИК-спектроскопии нуклеиновых кислот. В зарубежной литературе в 1965 г. опубликован обзор Шимановичи, Тзубои и Киококу ¹⁰, в котором авторы обобщили, главным образом, результаты собственных исследований ИК-спектров нуклеотидов, сахаров, фосфатов, синтетических полинуклеотидов, ДНК и РНК, а во время подготовки данного обзора — обзорная статья Тзубои ¹¹ по изучению структуры нуклеиновых кислот методом ИКС. Между тем за последние годы опубликовано множество работ по исследованию ИК-спектров нуклеиновых кислот, не вошедших в указанные обзоры.

II. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ИК-спектр ДНК был впервые освещен в 1948—1953 гг. Блаутом с сотр. для твердых образцов в области $4000\text{--}700\text{ см}^{-1}$ ^{12, 13} и для растворов в D_2O в области $1750\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ ^{14, 15}. В этих работах применяли неориентированные пленки ДНК и неполяризованное излучение. Спект-

* Принятые сокращения: А — аденин, Г — гуанин, Т — тимин, Ц — цитозин, У — урацил, И — инозин, ГМФ — гуанозинмонофосфат; поли-А — полирибоадениловая кислота; поли-(Г+Ц) — двойная спираль полигуаниловой и полицитидиловой кислот.

ры ориентированных пленок ДНК впервые опубликовал Фразер в 1951 г.¹⁶, однако он не учитывал влияния влажности образцов на спектры. В дальнейшем ряд авторов^{10, 17-23} исследовали колебательные спектры нуклеиновых кислот в области $4000-400\text{ см}^{-1}$, используя все современные возможности метода.

ИК-спектр ДНК, приведенный на рис. 2¹⁰, сравнительно прост: он представляет собой довольно «диффузную» картину, большинство полос в которой размыто, и лишь некоторые из них довольно отчетливы. Многие полосы заметно уширены и перекрываются с соседними полосами.

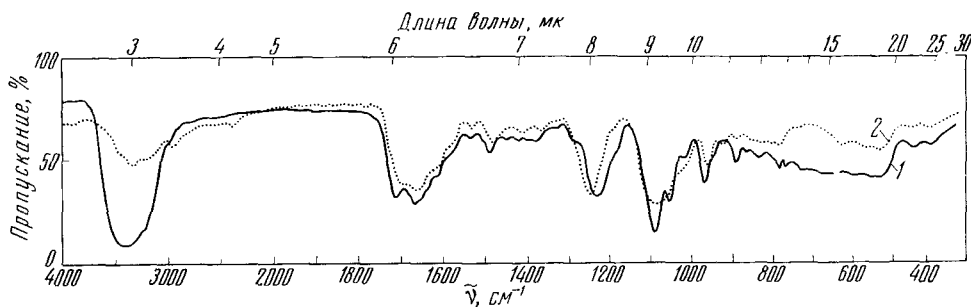


Рис. 2. ИК-спектр пленки Na ДНК при 75% (1) и 0% отн. вл. (2). ДНК тимуса теленка, $\tilde{\nu}$ — частота колебаний

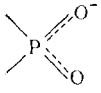
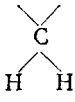
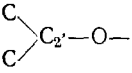
По группам полос поглощения в спектре условно можно выделить три области: области $4000-2000$ и $1700-1500\text{ см}^{-1}$, приписываемые обычно колебаниям оснований и СН-групп дезоксирибозы ДНК, и область $1300-1000\text{ см}^{-1}$, приписываемую колебаниям сахара и фосфатных групп скелета молекул ДНК. Отнесение полос ИК-спектра ДНК к колебаниям отдельных связей скелета и оснований ДНК приведено в табл. 1 и 2; это отнесение для большинства полос, за исключением полос в области $3500-2000\text{ см}^{-1}$, 1705 , 1220 , 1084 см^{-1} , следует рассматривать лишь как ориентировочное. Следует учитывать также, что колебания двойных связей колец оснований сильно сопряжены. В спектрах дейтерированной ДНК наблюдается сдвиг большинства полос поглощения в область низких частот вследствие изотопного обмена $\text{H}-\text{D}$ в NH_2 - и NH -группах оснований^{10, 18}.

Вид ИК-спектра ДНК несколько меняется с изменением влажности образца (рис. 3) — наблюдается смещение ряда полос — и спектр систематически улучшается при повышении относительной влажности (отн. вл.) до 92%^{17, 19} (контроль влажности осуществляется обычно помещением пленки ДНК в герметическую камеру над насыщенным раствором определенной соли, либо продуванием через камеру газа определенной влажности). Многие полосы становятся уже, перекрывание уменьшается, общий диффузионный фон спектра понижается. Подобная картина наблюдается при исследовании колебательных спектров аморфных синтетических полимеров^{36, 37}, и это заставляет думать, что причины такого спектрального поведения обусловлены сильным структурным несовершенством исследуемых объектов. Это заключение частично подтверждается рассмотрением ИК-спектра двойной спирали полирибонадениловой кислоты (поли-А)²⁸, приведенного на рис. 4. Простое исключение нерегулярности в чередовании оснований заметно меняет общую спектральную картину в лучшую сторону.

Поляризация полос поглощения ИК-спектра ДНК тоже зависит от влажности, причем дихроизм большинства полос проявляется достаточно отчетливо, хотя и не приводит к заметному улучшению качества

ТАБЛИЦА 1

Полосы колебаний скелета нуклеиновых кислот в ИК-спектре

Группа	Число групп	Интенсивность	Ожидаемая частота колебаний, см^{-1}	Частота в спектре, см^{-1}		
				в ДНК	в РНК	в поли-А
Ссылки на литературу			24—26	10, 17, 18	27	28
	1	с с	ν_{as} 1220 ν_s 1085	1230 \perp 1224 \parallel 1084 \perp 89 \perp	1225 \perp 1084 \parallel	1240 \perp 1090 \parallel
$-\text{C}-\text{O}-\text{P}$	2	с с	ν 1100 $\nu \sim 900$	1053 \perp 965 \perp	1070 \parallel 937 \perp	— 920 \parallel
$-\text{O}-\text{P}-\text{O}-$	1	ср сл	ν_{as} 820 ν_s 760—750	820 \parallel 784 \parallel	810 \perp	820
$-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ кольцо	1	с с сл с с	ν_{as} 1100—1070 ν_s 940—910 γ 650—600 ν_{as} 2970—2920 ν_s 2860—2850	1050 \perp 1024 \parallel 970 \perp 2900 2800	990 \perp , 960 \parallel	990 \perp , 965 \parallel 645 \parallel , 630 \parallel
	2	сл сл сл	δ 1465—1445 $\omega \sim 1380$ r 825—800	1450 \perp 1301 \perp 825 \parallel	890 \parallel 860 \parallel	880 \parallel 860 \parallel
$-\text{OH}$	1	с с сл	ν 3630 δ 1250 β 750—650	—	1250 \perp 780, 730	780 \parallel
	1	с	$\nu_{\text{вырожд}}$ 1125—1085 $\nu_s \sim 800$	—	1130—1120 \perp 810 \perp	1116 \perp 1130 \parallel 820 \perp
$\text{>C}-\text{H}$	3	ср сл сл	ν 2980—2890 δ 1440—1400 β 900—650	2850 1410 \perp	1400 \perp	1420 \perp
$-\text{C}-\text{C}$ кольцо	2	сл	ν 955	915	910	

Примечание. \parallel , \perp — поляризация; с — сильная; ср — средняя; сл — слабая; ν — валентные, δ — плоские, β — неплоские, r — маятниковые, ω — вращательные деформационные колебания, γ — деформационные колебания кольца.

спектральной картины (рис. 3). Дихроичное отношение многих полос обычно увеличивается при повышении относительной влажности кристаллических образцов ДНК.

В интервале 1750—1550 см^{-1} , где проявляются плоские колебания колец оснований, все полосы Na- и Li-ДНК поляризованы перпендикулярно направлению ориентации пленки. Аналогичная поляризация наблюдается также для валентных и плоских деформационных колебаний NH_2 , NH - и CH -групп в интервале 1600—1300 см^{-1} ^{18, 19}. Интересен факт, что полоса с частотой 1240 см^{-1} , соответствующая антисимметричным колебаниям PO_2^- -групп Na-ДНК ¹⁰, при низкой относительной влажности не проявляет дихроизма, а при повышении влажности сдвигается от 1240 к 1220 см^{-1} , расщепляясь на два компонента. По мнению Тзубои ¹¹, этот факт означает, что антисимметричные колебания каждой PO_2^- -группы не происходят независимо и что соседние PO_2^- -группы заметно взаимодействуют друг с другом, приводя к ряду колебаний, распростра-

ТАБЛИЦА 2

Полосы колебаний оснований в ИК-спектрах нуклеиновых кислот

Группа	Вид колебаний	Ожидаемая частота, см ⁻¹	Интенсивность	Частоты в спектре, см ⁻¹						
				Ц	У	Т	А	Г	ДНК	
									легк.	дейтер.
Ссылки на литературу		24—26		10, 29—32	10, 29, 33, 34	14, 33, 35	10, 29, 31, 32	10, 31 32	10, 17—19, 23	
—NH ₂ связ.	ν_{as}	3350	с	3367	—	—	3280	3340	3350	3103
	ν_s	3180		3155			3105	3077	3210	
—NH— связ.	ν	3180—3000	ср	2778	3110 2924	3175	3000	2840	2950	
—CH ₃	ν_{as}	2960	с	—	—	3035	—	—	2950	
	ν_s	2880—2820				2900				
=CH	ν	3000—2750	ср	3081 2947	3000	2780	2780	2680	3090	
—C=O	ν	1690—1650	с	1655	1724 1680	1735 1670	—	1700	1705	1685
—NH ₂	δ	1680—1600	с—ср	1667	—	—	1672	1681	1609	1557
—NH—	δ	1680—1560	с—ср	1538	1666 1418	1570		1555	1528	
—C=C—	ν	1680—1620	ср	1621	1623	1640	1578	1569	1575	1575
—C=N—	ν	1680—1630	ср—сл	1630	—	—	1605	1639	1655	1607
—NH ₂	β	1450	с—ср	1458	—	—	1451	1418	1444	
—NH—	β	1300—1200	ср		1388		1250	1263 1172	1296	
—CH ₃	δ_{as}	1460 ± 20	с	—	—	1500	—	—	1450	1458
	δ_s	1380—1370	ср			1380			1375	1375
Кольцо	ν	1480—1200	с	1527 1362 1236	1389 1238	1200	1418 1333	1477 1375	1503 1477	1516 1476
C—CH ₃	ν	1250—1200	сл	—	—	1245	—	—	1292	1300
C—NH ₂	ν	1300—1250	с	1275	—	—	1206	1215	1331	1331
=C—H	δ	1460	сл		1451	1380		1464	1456	1453
=C—N—	ν	1200—1150	сл	1156			1124			
—C—N—	ν	1250—1100	сл	1011	1099	1200			1296	1300
—NH ₂	β	900—600	ср		—	—	1022, 797	949	893	778
—NH	β	820—720	ср	823	822, 760	835	870	877, 776, 689	778	
—C—C	ν	1000—950	сл	995	994	1000	938		860	851
=C—H	β	860—700	сл	784	851	705		789, 703	795	794
Кольцо	γ	850—700	сл	794	780	740	722		727	715

няющихся на всю цепь. Компонент с меньшей частотой (1215 см^{-1}) и параллельным дихроизмом может относиться к колебаниям PO_2^- -групп, происходящим в фазе, а компонент с большей частотой (1225 см^{-1}) и перпендикулярным дихроизмом к колебаниям PO_2^- -групп, происходящим с разностью фаз $2\pi/n$, где n — число нуклеотидов на виток спирали

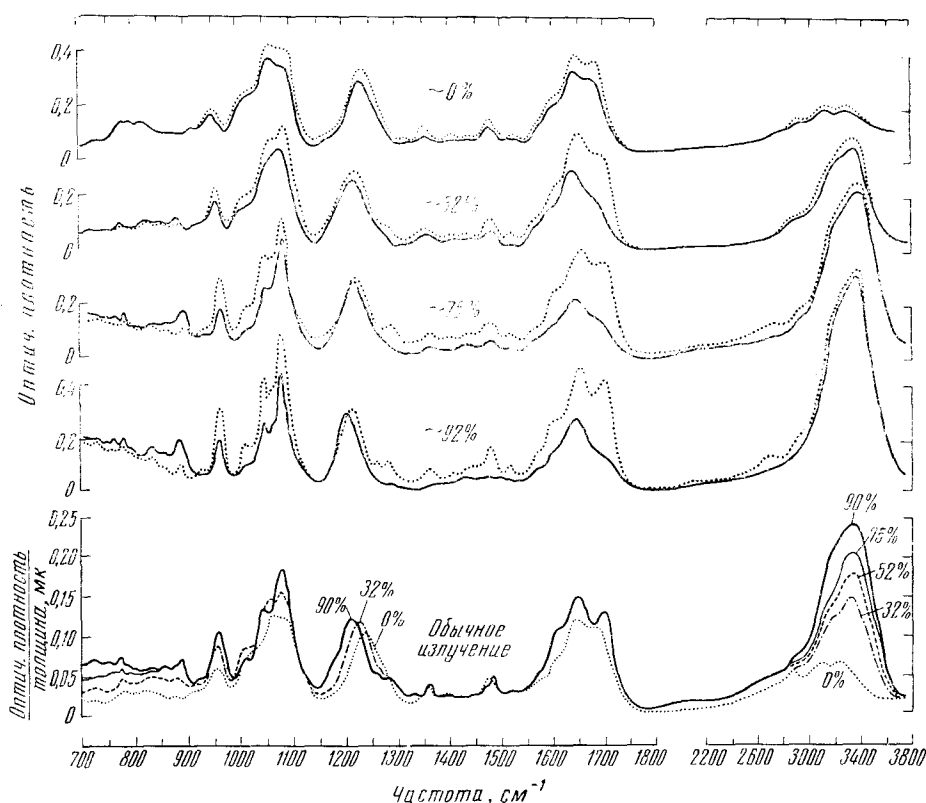


Рис. 3. Поляризованные ИК-спектры ориентированных пленок Na ДНК при различных отн. вл.¹⁷, пунктир — вектор излучения перпендикулярен (\perp), сплошная кривая — параллелен (\parallel) направлению ориентации образца

ДНК. Величина разности частот между этими компонентами ($\sim 10 \text{ см}^{-1}$) может характеризовать силу взаимодействия между PO_2^- -группами в данном кристаллическом образце Na-ДНК.

Полоса симметричных колебаний PO_2^- -групп ДНК (1089 см^{-1}) имеет перпендикулярный дихроизм. Аналогичная поляризация наблюдается и для полос поглощения в интервале $1100\text{—}900 \text{ см}^{-1}$, обусловленных в основном колебаниями сахара и фосфатных групп. Параллельным дихроизмом обладают полосы интервала $900\text{—}700 \text{ см}^{-1}$, где проявляются неплоские деформационные колебания N—H-связи^{17–19}.

Влияние повышения температуры от 22 до 90° на ИК-спектры ДНК обсуждено в работах многих авторов^{10, 20, 38, 39} и связано с разрушением вторичной структуры ДНК (см. разд. V).

ИК-спектры РНК исследованы в настоящее время достаточно подробно. Все общие характеристики спектра, указанные для ДНК, сохраняются и в случае РНК (рис. 5). Колебательный спектр РНК имеет набор интенсивных полос поглощения в областях $3500\text{—}2000$, $1700\text{—}1500$ и $1250\text{—}1050 \text{ см}^{-1}$. Однако в интервале частот $1100\text{—}800 \text{ см}^{-1}$, где поглощает сахарный компонент нуклеиновых кислот, наблюдается заметное различие спектров ДНК и РНК^{10, 39, 40}. Спектры РНК имеют полосы 1120 и 810 см^{-1} , отсутствующие в спектрах ДНК, и наоборот, полоса 1050 см^{-1} характерна только для дезоксирибополинуклеотидов. Спектральные характеристики различных видов РНК — рибосомной, транспортной и вирусной — во многом сходны друг с другом, однако детали

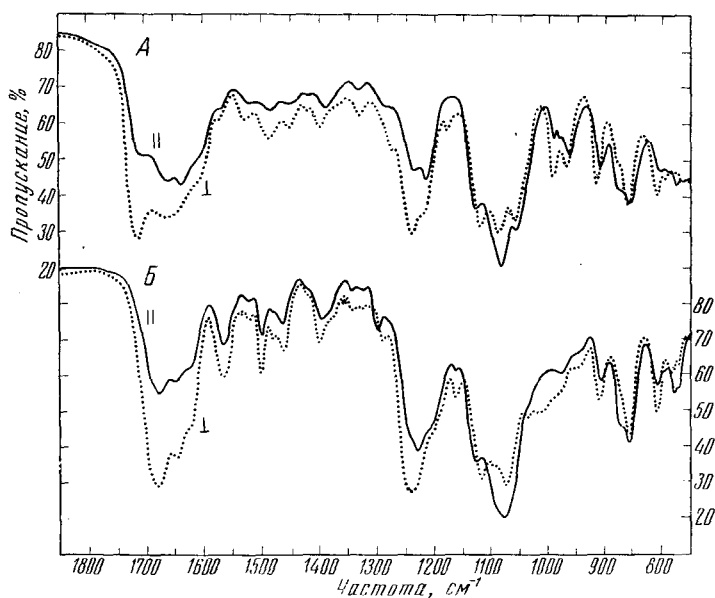


Рис. 5. Поляризованный ИК-спектр пленки Na РНК вируса карликового риса в Н- и D-формах (А и Б соответственно) при 75% отн. вл.²⁷

тах^{11, 28}, а спектры D₂O растворов двуспиральных поли-(А+У), поли-(Г+Ц) и поли-(И+Ц) измерены Майлзом с сотр.^{46–52}.

Попытки получить спектры комбинационного рассеяния (СКР) водных растворов ДНК и РНК долгое время оставались неудачными. Был известен лишь КР-спектр полиадениловой кислоты в одноцепочечном состоянии⁵³. СКР растворов ДНК зобной железы телят и рибосомной РНК *E. coli* были получены при помощи квантового генератора Тобином в 1969 г.⁵⁴ и Томасом в 1970 г.⁵⁵ соответственно. Положение полос в КР- и ИК-спектрах ДНК в основном совпадают, за исключением некоторого несоответствия в области 1700—1600 см⁻¹, а для КР-спектра РНК *E. coli*, напротив, наблюдается удовлетворительное совпадение положения полос в этой области с ИК-спектром⁴².

III. КОЛЕБАНИЯ ЦЕПИ ГЛАВНЫХ ВАЛЕНТНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В последнее время значительное развитие получила теория нормальных колебаний высокополимерных молекул, и, поскольку нуклеиновые кислоты являются полимерными молекулами, то вполне естественна попытка описать их колебательные спектры в рамках представлений, сформулированных для полимерных систем^{37, 56}.

Полный анализ колебательного спектра полимера — нахождение полного числа его нормальных колебаний, их поляризации, правил отбора в ИК- и КР-спектрах, а также расчет частот и форм нормальных колебаний, — возможен лишь для объектов, обладающих совершенной пространственной упорядоченностью. Как известно, ни ДНК, ни РНК, несмотря на их способность упаковываться в кристаллические решетки⁵⁷, не обладают таким совершенством из-за нерегулярной последовательности оснований. И только молекулы таких синтетических полинуклеотидов, как поли-А и поли-Ц имеют строгую химическую и пространствен-

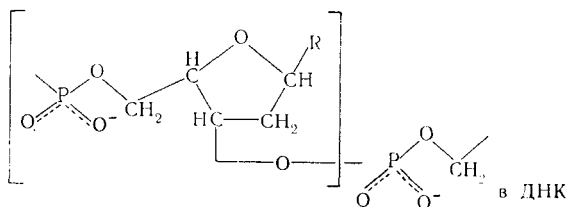
ную (в кристаллической фазе) периодичность и могут рассматриваться как регулярные. К сожалению, данные о колебательных спектрах этих систем в литературе весьма ограничены^{10, 28}, хотя они могут оказаться незаменимыми при расшифровке колебательных спектров нуклеиновых кислот. В то же время основные цепи (скелет) молекул ДНК и РНК имеют регулярное химическое строение, а при определенных условиях — и регулярную конформационную структуру^{5, 58–60}, что позволяет рассматривать нормальные колебания скелета этих молекул, используя свойства периодичности. Строго говоря, колебательные спектры таких спиральных комплексов должны быть обусловлены колебаниями атомов в обеих цепочках и их взаимодействиями. Однако можно думать, что взаимодействие колебаний цепочек в двойной спирали должно быть весьма незначительным, так как они разделены значительным расстоянием (диаметр спирали ~ 20 Å). Взаимодействиями между различными двойными спиралями в кристаллической фазе также можно пренебречь. Наиболее сильное взаимодействие основных цепей ДНК и РНК осуществляется за счет водородных связей между основаниями, однако такое взаимодействие влияет главным образом на колебания атомов в основаниях, практически не возмущая колебания атомов основной цепи. Это позволяет предположить, что обе цепи в двойной спирали имеют идентичные колебательные спектры, и для анализа последних достаточно рассмотреть колебания одной цепи, формально считая их дважды вырожденными.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что ожидаемый колебательный спектр нуклеиновых кислот как полимерных образований получится при рассмотрении одной цепочки двойной спирали с регулярным строением скелета и случайной последовательностью оснований.

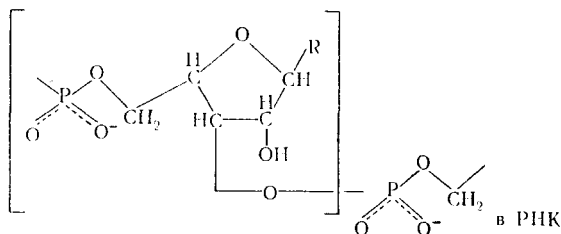
Рассмотрим ожидаемый колебательный спектр моделей



где R — точечная масса, заменяющая любое из четырех оснований, а M — мономерное звено, имеющее следующее строение:



$M=18$ атомов (без R),



$M=19$ атомов (без R).

Такая модель является, по-видимому, хорошим первым приближением, поскольку для нее искажены только те колебания скелета, которые сильно «смешиваются» с колебаниями оснований.

Считая цепочки моделей бесконечно длинными регулярными макромолекулами, структуру которых можно записать в виде $[M_i]_\infty$ — где M_i — повторяющееся звено цепи, выведем общий вид колебательного спектра таких систем. Структура таких модельных цепей принадлежит одномерной пространственной группе, имеющей циклическую факторгруппу $C(\pi/5)$, которая изоморфна точечной группе C_5 ^{61, 62}. В табл. 3

ТАБЛИЦА 3

Характеры, число нормальных колебаний и правила отбора для колебаний основной цепи ДНК (фактор-группа $C(\pi/5)$)

$C(\pi/5)$	E	C^1	C^2	$C^3 \dots C^4$	N	Активность	
						ИК	КР
A	1	1	1	1...1	$3 \cdot 18 - 2 = 52$ (T_π, R_π)	Акт. (\parallel)	Запр.
B	1	—1	1	—1...—1	$3 \cdot 18 = 54$	Запр.	Акт.
E_1	2	$\varepsilon^{\pm 1}$	$\varepsilon^{\pm 2}$	$\varepsilon^{\pm 3} \dots \varepsilon^{\pm 9}$	$3 \cdot 18 - 1 = 53$ (T_σ)	Акт. (\perp)	»
E_2	2	$\varepsilon^{\pm 2}$	$\varepsilon^{\pm 4}$	$\varepsilon^{\pm 6} \dots \varepsilon^{\pm 18}$	$3 \cdot 18 = 54$	Запр.	»
E_3	2	$\varepsilon^{\pm 3}$	$\varepsilon^{\pm 6}$	$\varepsilon^{\pm 9} \dots \varepsilon^{\pm 27}$	54	»	Запр.
E_4	2	$\varepsilon^{\pm 4}$	$\varepsilon^{\pm 8}$	$\varepsilon^{\pm 12} \dots \varepsilon^{\pm 36}$	54	»	»

Примечание. ИК—инфракрасный спектр, КР—комбинационное рассеяние; N —число нормальных колебаний; Акт.—колебания активны; запр.—колебания запрещены; T —чистые трансляции всей цепи параллельно (\parallel) и перпендикулярно (\perp) ее оси; R_π —вращение цепи как целого вокруг соответствующей оси; CK —поворот на угол $K \cdot \omega$, $\omega = 2\pi/10$; $\varepsilon = \exp[i(2\pi/10)]$.

приведены характеры, число нормальных колебаний и правила отбора для основной цепи ДНК. Для вирусной РНК, содержащей 10 нуклеотидов на виток спирали, фактор-группа остается той же самой и характеристики спектра оказываются следующими:

$$\begin{array}{ll}
 M=20 \text{ (включая } R) & E_1 = 59 \text{ (}\perp\text{) (ИК), (КР)} \\
 A=3 \cdot 20 - 2 = 58 \text{ (}\parallel\text{) (ИК)} & E_2 = 60 \text{ (КР)} \\
 B=60 & E_3 = 60 \\
 & E_4 = 60 \} \text{ запрещены (ИК, КР)}
 \end{array}$$

Двойная спираль поли-А имеет фактор-группу $C(\pi/2)$, $M=32$ (звено цепи вместе с аденином) и следующие нормальные колебания:

$$\begin{array}{ll}
 A=3 \cdot 32 - 2 = 94 & E_1 = 95 \\
 B=96 & E_2 = 96
 \end{array}$$

Из рассмотрения такой модели сразу же видно, что общее число полос в реальных ИК-спектрах нуклеиновых кислот много меньше ожидаемого. Это обстоятельство может быть обусловлено несколькими причинами: 1) малой интенсивностью ряда полос; 2) существованием многих полос в области частот ниже 400 см^{-1} ; 3) нерегулярностью структуры молекул, что приводит к уширению полос и псевдоупрощению общей картины.

IV. КОЛЕБАНИЯ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

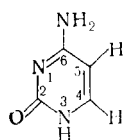
Как указано выше, теоретический расчет нормальных колебаний оснований нуклеиновых кислот произвести трудно из-за сложности их структуры, и работ, посвященных этому вопросу в литературе очень

мало. Так, Канаскова⁶³ выполнила расчет частот и форм нормальных колебаний свободных пиримидина, имидазола и пурина на основе валентно-силового поля этих молекул.

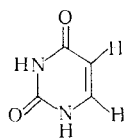
1. Спектры свободных оснований

Основания нуклеиновых кислот представляют собой amino-кетопроизводные пурина и пиримидина — гетероциклов, содержащих в кольце атомы азота.

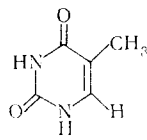
Пиримидиновые основания



Цитозин

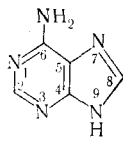


Урацил

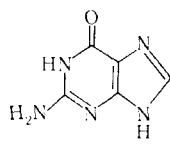


Тимин

Пуриновые основания



Аденин



Гуанин

Вопрос о кето-анольной и amino-иминной таутомерии оснований в твердой фазе был решен при помощи ИК-спектроскопии еще в ранних исследованиях^{29, 64-73}.

Молекулы оснований лишены элементов симметрии и, согласно кристаллографическим данным⁷⁴⁻⁸¹, обладают плоской конфигурацией. Основные характеристики кристаллов представлены в табл. 4.

ТАБЛИЦА 4

Кристаллографические характеристики оснований нуклеиновых кислот^{74-77, 81}

Основание	Ц	У	Т	А	Г
Ячейка	орторомбическая	моноклинная	—	моноклинная	моноклинная
Пространственная группа	P_{212121}	P_{21}	$P_{21/C}$	P_{21}	P_{21}
Число молекул в ячейке	4	4	4	2	2

В соответствии с правилами отбора⁶², свободные основания нуклеиновых кислот должны иметь активными в ИК-спектре все $3N - 6$ нормальных колебаний (урацил — 30, цитозин — 33, аденин — 36, тимин — 39, гуанин — 42).

ИК-спектры оснований нуклеиновых кислот, нуклеозидов (основание + сахар) и нуклеотидов (нуклеозид-фосфатов), являющихся составными частями полинуклеотидных цепей ДНК и РНК, приведены в многочисленных работах^{24, 30, 32, 33, 70-72, 82-96}, в которых проведено отнесение полос поглощения. В большинстве работ измеряли спектры этих соединений в твердой фазе (таблетки в КВг или эмульсии) в легкой или дейтерированной формах в интервале частот $4000-700\text{ см}^{-1}$, и лишь в немногих^{14, 31, 35, 97-101} — спектры D_2O растворов в узком интервале частот $1700-1500\text{ см}^{-1}$. Спектры оснований и нуклеозидов в твердой фазе, как правило, состоят из узких, хорошо разрешенных полос (рис. 6, 7).

Для изолированных оснований нуклеиновых кислот можно ожидать в области $3500-2000\text{ см}^{-1}$ проявление интенсивных полос валентных колебаний NH -, NH_2 - и CH -групп; в области $1800-1500\text{ см}^{-1}$ — интенсивных полос колебаний карбонильных групп и полос средней интенсивно-

сти колебаний двойных связей колец оснований, а также полос деформационных колебаний NH- и NH_2 -групп; в области $1500\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ следует ожидать полос средней и низкой интенсивности, связанных с колебаниями одинарных C—C- и C—N- связей, деформационными колебаниями C—H- и N—H- связей и колебаниями скелета оснований; в области $1000\text{--}700\text{ см}^{-1}$ — слабые полосы неплоских деформационных колебаний NH- и CH- групп. ИК-спектры оснований нуклеиновых кислот приведены на рис. 6—8; положения и отнесения основных полос поглощения — в табл. 2, 5, 6.

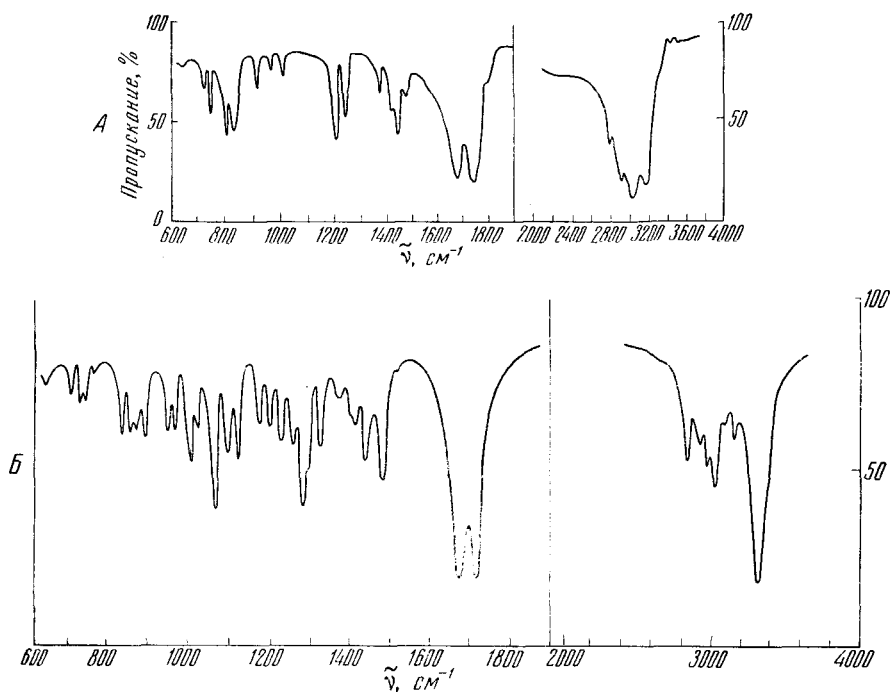


Рис. 6. ИК-спектр твердого тимина (А) и тимидина (Б), нейтральная среда³²

В спектре цитозина (рис. 7) наблюдаются интенсивные полосы валентных колебаний аминогруппы при 3367 и 3155 см^{-1} и полоса валентных колебаний N—H- связи при 2778 см^{-1} , смещающиеся при дейтерировании в низкочастотную область, а также полосы средней интенсивности валентных колебаний C—H- связей при 3081 и 2948 см^{-1} , на положение которых дейтерирование почти не влияет^{29, 30, 32, 104}. Действительно, методом ИК-спектроскопии и другими методами измерена скорость изотопного обмена атомов водорода оснований ДНК и показано, что атомы H в NH- и NH_2 -группах обмениваются практически мгновенно, а в CH- группах — очень медленно^{17, 18, 103, 105–116}. Частоты колебаний амино- и иминогрупп оснований свидетельствуют о том, что как в растворах, так и в кристаллах между молекулами оснований существуют водородные связи^{76, 79–81}.

Полосы валентных колебаний двойных связей оснований удобно наблюдать для их дейтерированных форм (рис. 8), поскольку перекрывающиеся с ними полосы деформационных колебаний NH_2 - и NH- групп смещаются в длинноволновую область. При этом происходит также смещение полос двойных связей в сторону меньших частот, что отражает

ТАБЛИЦА 5

Полосы поглощения свободных оснований в ИК- и КР-спектрах

Цитозин							Урацил							Тимин	
ИК ¹⁰ , 29—31, 33, 35, 82, 97, 98			КР ¹⁰³			отношение	ИК ¹⁰ , 29, 31, 33, 34			КР ¹⁰³			отношение	ИК ¹⁴ , 33	
твердая фаза	твердая фаза за дейтер.	D ₂ O* pD 7	твердая фаза	H ₂ O pH 7	D ₂ O pD 7		твердая фаза	твердая фаза за дейтер.	D ₂ O* pD 7	твердая фаза	H ₂ O pH 7	D ₂ O pD 7		твердая фаза	отношение
3367 с	3078 ср	—	—	—	—	$\nu_{as} \text{NH}_2$	3410 с	3065 ср	—	—	—	—	$\nu \text{N}_3\text{H}$	3175 с	νNH
	2940 ср	—	—	—	—	$\nu_s \text{NH}_2$	3100 с	2400 сл					νCH	3035 с	$\nu_{as} \text{CH}_3$
3115 с	2525 с	—	—	—	—								$\nu \text{N}_1\text{H}$	2900 с	$\nu_s \text{CH}_3$
3081 ср						νCH	2924 с	2268 с						2780 ср	νCH
2948 ср	2320 с					νNH		2135 с					$\nu \text{C}=\text{O}$	1735 с	$\nu \text{C}=\text{O}$
2778 ср	2155 с						1724 с	1712 с	1690 с	1662 ср	1680 ср	1690 ср	$\nu \text{C}=\text{O}$	1670 с	$\nu \text{C}=\text{O}$
						δNH_2	1680 ср	1690 с	1655 с	1655 ср	1640 ср	1650 ср	δNH		
1667 с	1680 сл	1652 с	1660 ср	1660 сл	1650 сл	$\nu \text{C}=\text{O}$	1666 с	1640 с					$\nu \text{C}=\text{C}$	1640 ср	$\nu \text{C}=\text{C}$
1655 ср		1615 ср	1635 сл		1610 ср	$\nu \text{C}=\text{N}$	1623 сл	1630 сл	1620 сл	1620 сл		1633 сл			
1630 ср	1637 с	1582 сл				$\nu \text{C}=\text{C}$									
1621 сл	1605 с							1565 сл	1582 сл	1580 сл				1570 ср	δNH
			1575 сл						1527 с					1540 ср	
1595 ср						$\delta \text{N}_3\text{H}$	1508 ср	1475 с						1500 ср	δCH_3
1538 ср	1548 сл					Кольцо	1451 с	1475 с		1460 сл	1500 сл		Кольцо	1380 сл	βCH_3
1527 сл		1527 сл	1540 сл	1530 сл	1510 сл	»									
1506 сл	1502 с	1504 с	1500 сл			βNH_2	1418 с	1422 сл		1423 сл	1425 сл		βNH	1245 ср	$\nu \text{C}-\text{CH}_3$
1458 с				1440 сл		Кольцо	1389 с	1390 сл			1390 сл		βNH	1200 ср	
1362 с	1374 с	1365	1366 сл	1365 сл	1388 сл	$\nu \text{C}-\text{NH}_2$	1238 с	1230 сл		1237 с	1235 с	1270 с	Кольцо	1040 сл	$\nu \text{C}-\text{C}$
1275 с	1279 ср		1278 с	1290 с	1290 с	Кольцо	1099 сл	1140 с		1105 сл		1158 сл	$\nu \text{C}-\text{N}$	1000 сл	
1236 сл	1235 сл		1255 сл	1228 сл		$\nu \text{C}-\text{N}$	1004 с			1011 сл				945 сл	
1156 сл	1178 сл		1125 сл		1140 сл		994 с	980 с		987 сл				900 сл	
							851 ср	882 ср						835 ср	} βNH
1011 сл	1046 сл		1010 сл			$\nu \text{C}-\text{C}$	822 с	820 с				815 сл	βNH	800 ср	
995 сл	978 сл		965 сл	975 сл	980 сл	$\beta \text{N}_3\text{H}$	780 сл			781 с		783 ср	Кольцо	740 ср	
823 ср			820 сл			Кольцо	760 ср						βNH	705 сл	
794 с	787 с		794 с	787 с	777 с										
784 сл	771 сл					βCH		733 сл		580 сл					

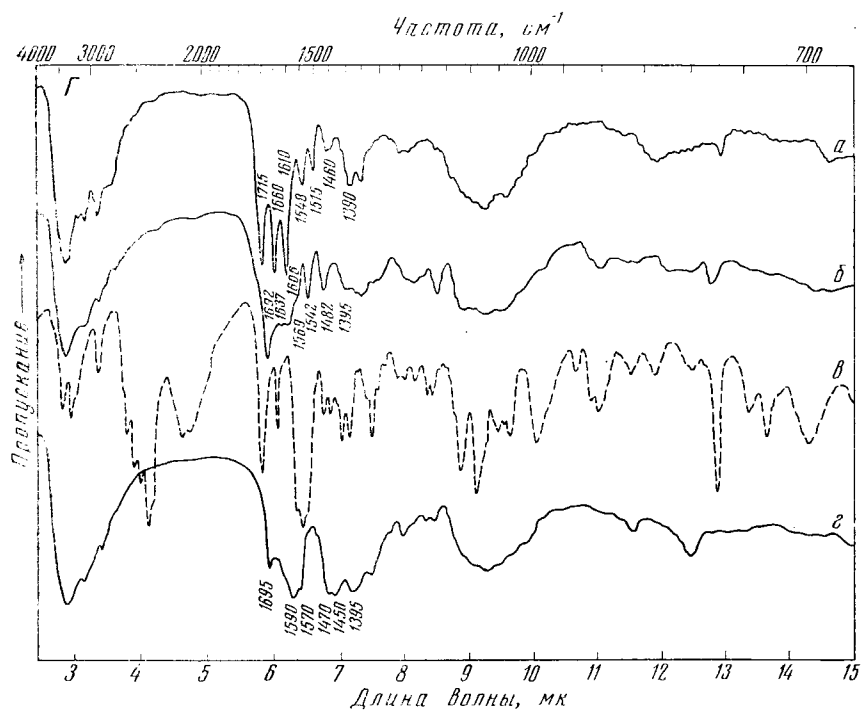
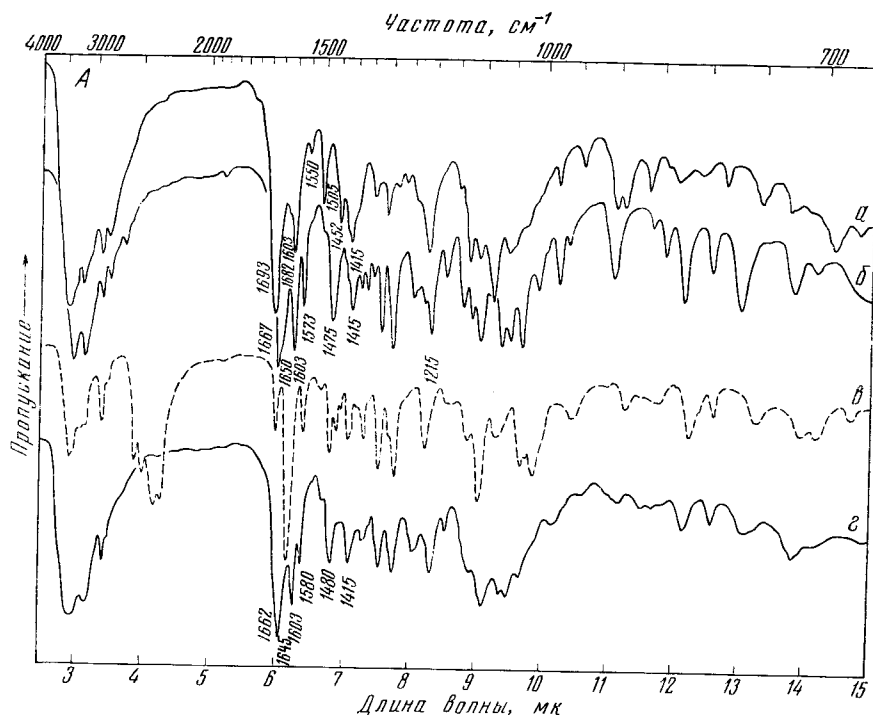
* Нуклеозид.

ТАБЛИЦА 6

Полосы поглощения свободных оснований в ИК- и КР-спектрах

Адепин						Гуанин						
ИК ^{10, 20, 31, 32, 104}			КР ¹⁰³			отношение	ИК ^{10, 20, 31, 32}			КР ¹⁰³		отношение
твердая фаза	твердая фаза дейтер.	D ₂ O* pD 7	твердая фаза	H ₂ O pH 7	D ₂ O pD 7		твердая фаза	твердая фаза дейтер.	D ₂ O* pD 0,5	H ₂ O pH 0,5	D ₂ O pD 0,5	
3280 ср						$\nu_{as} \text{NH}_2$	3310 с	3300 с				$\nu_{as}^* \text{NH}_2$
3105 с	3096 сл					$\nu_s \text{NH}_2$	3077 с	3086 с				$\nu_s \text{NH}_2$
3000 сл	2463 ср					νNH	2840 с	2872 ср 2688 ср				νNH
2780 сл	2288 с					νCH	2680 с	2494 ср 2278 с				νCH
2680 сл	2155 ср						1701 с	1695 с	1690 с	1685 сл	1680 сл	$\nu \text{C=O}$
1672 с	1675 сл					δNH_2	1681 с	1678 сл				δNH_2
1605 ср	1610 с	1627 с	1600 сл		1613 сл	$\nu \text{C=N}$	1639 сл	1616 с	1609 ср			$\nu \text{C=N}$
1578 ср	1575 с	1578 ср		1585 ср	1563 ср	$\nu \text{C=C}$	1569 ср	1565 ср	1578 с			$\nu \text{C=C}$
1510 сл	1510 с		1530 сл	1512 ср	1512 ср	Кольцо	1555 ср		1568 сл	1541 сл	1525 сл	δNH
	1475 ср	1484 сл	1485 ср	1490 сл	1480		1477 ср	1475 ср		1489 с	1480 с	Кольцо
1451 ср	1460 ср		1462 сл			βNH_2	1464 ср	1460 ср				δCH
1418 ср	1420 ср			1425 сл	1435 с	Кольцо	1418 ср	1418 сл		1412 сл	1400 сл	βNH_2
1368 сл	1375 ср		1370 сл	1380 ср	1350 ср	»	1375 с	1364 с		1372 ср	1360 сл	Кольцо
1333 ср	1335 с		1332 с	1340 с	1328 с	»	1263 с	1261 сл		1240 сл		$\nu \text{C-NH}_2$
1305 ср	1310 с		1312 сл	1310 ср			1215 сл	1215 сл				
1250 ср	1250 сл		1252 ср	1253 сл	1238 сл	βNH	1172 с	1167 ср		1175 сл	1176 сл	βNH
1215 ср	1226 сл		1225 сл	1216 сл		$\nu \text{C-NH}_2$	949 с	948 сл		1080 сл		βNH_2
1124 ср	1130 сл		1130 сл			$\nu \text{C-N}$	877 ср	876 сл		1025 сл		βNH
1022 ср	1010 сл		1025 сл	1010 сл		βNH_2	851 с	850 ср				
							789 сл					βCH
938 ср	935 ср		945 ср			$\nu \text{C-C}$	776 с	776 ср				βNH
870 сл	855 сл		870 сл	870 сл		$\beta \text{N}_9\text{H}$	703 ср					βCH
847 ср							689 ср	687 сл				βNH
797 ср	796 сл			800 сл		βNH_2						
722 ср	720 сл		725 ср	733 ср	724 сл	Кольцо						

* Нуклеозид.



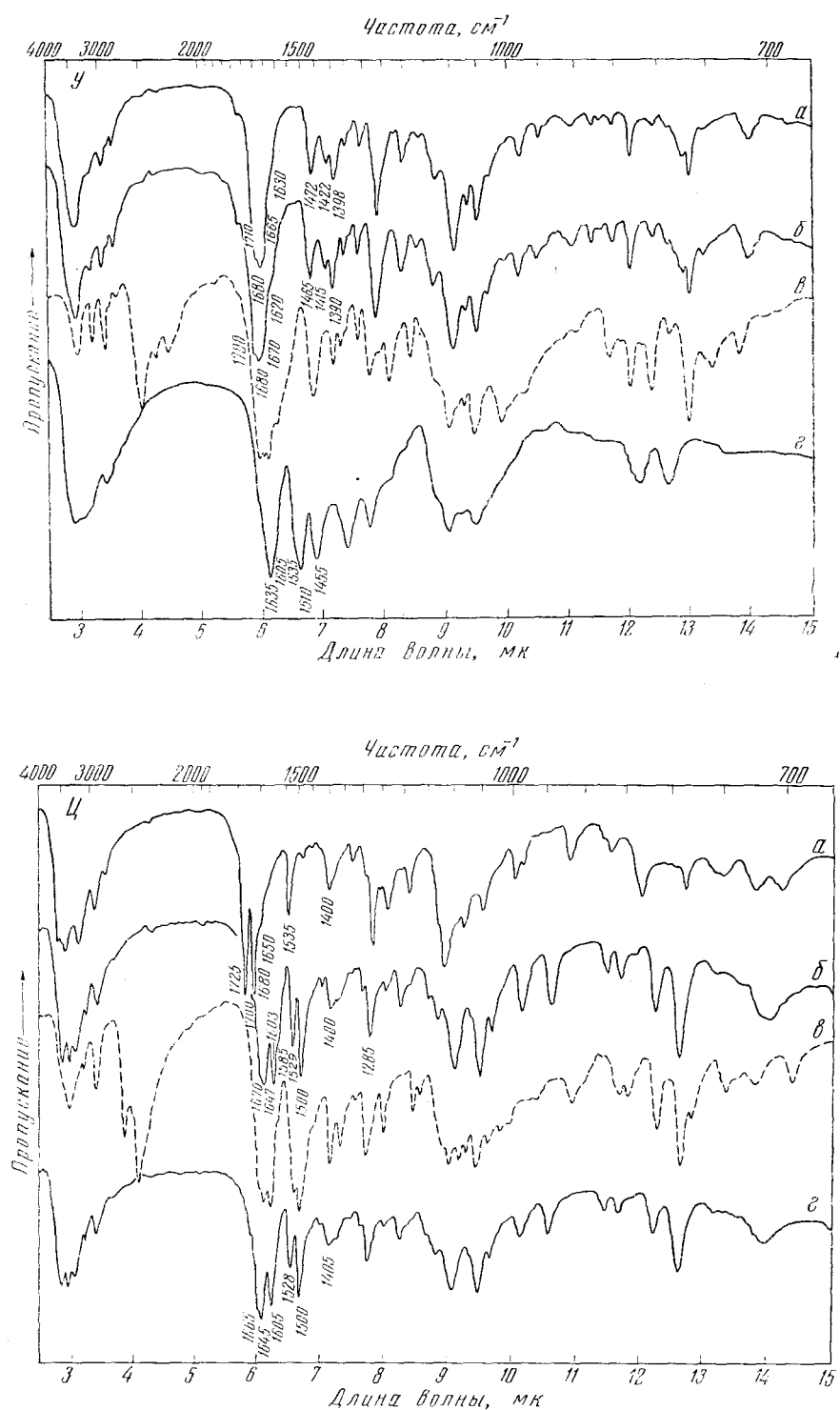


Рис. 7. ИК-спектры твердых нуклеозидов³¹: а — из кислого раствора (H_2O), б — из нейтрального H_2O раствора, в — из нейтрального D_2O раствора, г — из щелочного раствора (H_2O)

наличие взаимодействия деформационных колебаний NH - и NH_2 -групп с колебаниями двойных связей кольца и $\text{C}=\text{O}$ -групп ^{10, 31}. Такое смещение наблюдается, например, в спектре D_2O раствора цитозина для полос $\text{C}_6=\text{N}$ - и $\text{C}=\text{C}$ -связей (см. табл. 5), соседних с аминогруппой. Для легкой формы цитозина в твердой фазе колебания $\text{C}=\text{C}$ -группы и деформационные колебания NH_2 -группы дают две полосы в виде дублета (1655 и 1667 см^{-1} , соответственно). Частоты колебаний двойных связей цитозина ($\text{C}=\text{O}$ 1655, $\text{C}=\text{N}$ 1630, $\text{C}=\text{C}$ 1621 см^{-1}) понижены, вероятно, вследствие сопряжения.

Колебания кольца цитозина проявляются в спектре в виде полос 1527 и 1365 см^{-1} , близких по частотам к характерным полосам поглощения

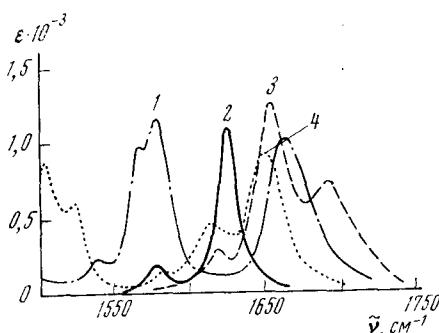


Рис. 8. ИК-спектры D_2O растворов нуклеотидов: 1 — гуанина, 2 — аденина, 3 — урацила, 4 — цитозина, $\text{pD} 7^{102}$ ϵ — молярный коэффициент поглощения

пиримидинового кольца 1565, 1462 и 1397 см^{-1} ⁸⁹, которые не отнесены к колебаниям отдельных связей кольца. Эти полосы, а также полосы 1236 и 794 см^{-1} активны в спектрах комбинационного рассеяния цитозина ¹⁰³.

На частоты колебаний оснований в общем влияют заместители в положениях N_3 пиримидинов и N_9 пуринов. Однако присоединение дезоксирибозы или рибозы приводит лишь к незначительным сдвигам в спектрах оснований. Спектры нуклеозидов усложняются вследствие появления полос

поглощения сахара: полос валентных колебаний OH - и CH -связей в области 3700—2000 см^{-1} , деформационных колебаний гидроксильных групп в области 1350—1110 см^{-1} и колебаний рибозного кольца в области 1110—900 см^{-1} (рис. 6) ^{10, 29, 32}. В спектрах нуклеотидов появляются еще характерные полосы фосфатной группы — 1220 и 1089 см^{-1} , а в случае цитидиловой и адениловой кислот — весьма существенные смещения полос оснований вследствие образования цвиттер-ионов (отрицательный заряд на фосфатной группе и положительный на основании) ^{29, 82}.

Урацил и тимин, близкие по строению молекул, имеют и сходные ИК-спектры (рис. 6, 7). Оба основания имеют по две карбонильных группы: $\text{C}_6=\text{O}$ -группу, сопряженную с $\text{C}=\text{C}$ -связью, и $\text{C}_2=\text{O}$ -группу, расположенную между иминогруппами. Для карбонильных групп в том и другом положении влияние окружения должно было бы приводить к снижению частот их колебаний по сравнению с характеристическими частотами колебаний карбонильных групп в кетонах (1725—1705 см^{-1}). Действительно, колебания $\text{C}=\text{O}$ -группы в молекуле имидазолоната имеют частоту 1684 см^{-1} ¹⁰⁸. Однако в спектре кристаллического урацила наблюдаются две полосы с частотами 1735 и 1670 см^{-1} ^{29, 32, 33}, и частота первой из них повышена по сравнению с ожидаемой. Полосу 1670 см^{-1} относят к колебаниям $\text{C}_6=\text{O}$ -группы, сопряженной с $\text{C}=\text{C}$ -связью, а 1730 см^{-1} — к колебаниям $\text{C}_2=\text{O}$ -группы ^{29, 31—33}. Вероятно, между карбонильными группами в молекулах урацила и тимина существует взаимодействие, известное для дикарбонильных соединений и смещающее колебания одной из групп в высокочастотную область ¹⁰⁹. Возможно также, что повышение частоты колебаний $\text{C}_2=\text{O}$ -группы обусловлено его смещением с колебаниями N_1H -связи.

Авторы работы³³ определили кратность (n) и длину (r) связей карбонильных групп урацила, исходя из частот их колебаний в ИК-спектре и эмпирических зависимостей между этими величинами, приведенными в работах^{110, 111}. Частоте колебаний $C_2=O$ -группы (1735 см^{-1}) соответствуют значения $n=2,07$ и $r=1,225\text{ Å}$, а для $C_6=O$ -группы (1670 см^{-1}) $n=1,85$ и $r=1,241\text{ Å}$; полученные значения r хорошо согласуются с рентгеноструктурными данными⁸⁰. Интенсивные полосы 1451 и 1238 см^{-1} и слабую полосу 780 см^{-1} относят к колебаниям кольца урацила, сопряженным с деформациями NH -связей.

Спектр тимина отличается от спектра урацила в основном наличием полос, соответствующих валентным и деформационным колебаниям метильной группы.

В низкочастотной области спектра ($700\text{—}200\text{ см}^{-1}$) полизамещенные пиримидины обладают двумя интенсивными полосами поглощения при 525 ± 25 и $450\pm 25\text{ см}^{-1}$, соответствующими неплоским и плоским деформационным колебаниям пиримидинового кольца^{111–115}. Полоса 450 см^{-1} может служить для идентификации, так как на ее положение не оказывают влияние заместители. Положение полосы неплоских колебаний пиримидинового кольца ($525\pm 25\text{ см}^{-1}$) зависит от массы заместителей (NH_2 -, OH -, SH - и $S-CH_3$ -групп), причем эта зависимость линейна¹¹⁶.

Гуанин обладает структурным сходством с цитозином. Однако частота колебаний его карбонильной группы (1700 см^{-1}) значительно выше, чем в цитозине (1655 см^{-1}), и выше ожидаемой частоты колебаний $C=O$ -группы, сопряженной с двойной $C=C$ -связью. В спектре гуанина наблюдаются интенсивные полосы, характерные для пуринового кольца⁸⁸: 1639 ($C=N$), 1567 ($C=C$), 1518 , 1477 и 1375 см^{-1} ^{29, 31, 32}. Дейтерирование гуанина сопровождается небольшим снижением частот $C=O$ - и $C=N$ -связей, что может свидетельствовать о незначительном взаимодействии их колебаний с колебаниями NH - и NH_2 -групп.

Аденин — единственное основание, не содержащее карбонильной группы. Его аминогруппа дает интенсивные полосы при 3280 , 3105 см^{-1} (ν) и 1672 , 1451 , 1022 и 797 см^{-1} (β и δ)^{29, 32, 65}. Колебания аминогруппы сильно взаимодействуют с колебаниями прилежащей $C=N$ -связи, вследствие чего частота последней повышается при дейтерировании аденина с 1605 до 1627 см^{-1} ⁵⁹. Поскольку структура аденина отличается от структуры пурина лишь наличием одного заместителя, в его спектре наблюдается шесть характерных полос скелетных колебаний пурина с частотами 1605 ($C=N$), 1575 ($C=C$), 1510 , 1458 , 1418 и 1368 см^{-1} ^{10, 29, 32, 97}. Полоса валентных колебаний $C=C$ -связи обычно имеет малую интенсивность в ИК-спектрах, однако в спектре аденина она достаточно интенсивна, возможно, за счет ароматического характера кольца этого основания.

При изучении влияния температуры на ИК-спектры кристаллических оснований Сухоруков, Канаскова и Пентин с сотр.^{33, 63, 117, 118} обнаружили, что для имидазола, пурина и ряда их производных в интервале от -160 до $+100^\circ$ наиболее чувствительными к изменению температуры являются полосы неплоских деформационных колебаний NH - и NH_2 -групп. Показано, что зависимость частот неплоских колебаний этих групп от температуры во всех случаях является линейной и может быть описана уравнением: $\nu_{\text{нел.}} = A - BT$, где A и B — константы, характерные для каждого соединения. В связи с этим предложен метод идентификации частот неплоских деформационных колебаний NH - и NH_2 -групп азотистых оснований, названный методом температурного сдвига^{63, 117}. Этим методом авторы идентифицировали ряд полос в ИК-спектрах аденина и его N -метилзамещенных. С другой стороны, показано, что сме-

щение частот протон-донорных NH - и NH_2 -групп зависит от длины водородных связей (r), образуемых этими группами: $B = 0,93 - 0,29 r$ (для NH); $B = 0,83 - 0,27 r$ (для NH_2). Предложенный метод температурного сдвига позволяет различить полосы деформационных колебаний NH - и NH_2 -групп и в сочетании с другими методами более надежно устанавливать структуру оснований в кристаллическом состоянии.

Спектры КР свободных оснований и нуклеозидов в твердой фазе и в растворе измерили Лорд и Томас¹⁰³. Частоты этих спектров даны в табл. 5, 6.

Полосы деформационных колебаний NH - и NH_2 -групп в КР-спектрах очень слабы и не проявляются совсем, а двойные связи и колебания кольца дают более интенсивные полосы, чем в ИК-спектрах. Рибоза и фосфат дают очень слабые полосы КР. В спектрах КР сильно поляризованы полосы карбонильных групп и полосы в области $800 - 750 \text{ см}^{-1}$ в спектрах пиримидинов и в области $730 - 680 \text{ см}^{-1}$ в спектрах пуринов. В области $1500 - 1200 \text{ см}^{-1}$ наблюдаются полосы средней поляризации. Деполаризационное отношение определяется локальной, планарной симметрией кольца основания, причем плоские деформационные колебания поляризованы, а неплоские — деполаризованы.

2. Спектры азотистых оснований в составе полинуклеотидов

Основной задачей при изучении ИК-спектров полинуклеотидов является нахождение специфических спектральных характеристик взаимодействия оснований, находящихся в составе нуклеиновых кислот, в отличие от таковых для свободных оснований.

При рассмотрении полос колебаний оснований в составе полинуклеотидов и нуклеиновых кислот следует ожидать смещений некоторых частот вследствие усиления взаимодействия между комплементарными основаниями, поскольку известно, что специфическое взаимодействие комплементарных оснований через водородные связи значительно сильнее их самоассоциации (см. гл. VI). Кроме того, определенный вклад в изменение частот колебаний оснований может вносить дисперсионное взаимодействие π -электронов оснований в вертикальных «стопках» внутри полинуклеотидной цепи.

Отнесение полос поглощения к колебаниям определенных групп оснований в составе нуклеиновых кислот имеется в литературе только для валентных колебаний NH_2 (3350 и 3210 см^{-1}) NH (2950 см^{-1}) и CH (3090 см^{-1}) групп^{10, 17-19}. Обсуждалась также полоса 1705 см^{-1} , характерная для спектров нативных препаратов ДНК и РНК, которая при дейтерировании образцов смещается в сторону низких частот до 1685 см^{-1} . По мнению Шиманоучи и Тзубои^{10, 38, 39}, а также Фритцше²⁰, полоса 1705 см^{-1} связана с валентными колебаниями карбонильных групп оснований, взаимодействующих с деформационными колебаниями аминогрупп. Частота этой полосы выше частот колебаний карбонильных групп свободных оснований (за исключением одной из групп тимина и урацила). Это повышение частоты колебаний C=O -групп оснований в составе нуклеиновых кислот обусловлено, по-видимому, их участием в водородных связях между комплементарными основаниями.

Отнесение остальных полос поглощения оснований в нуклеиновых кислотах и в литературе почти отсутствует. Основываясь на опубликованных экспериментальных данных, мы попытались дать более детальное отнесение полос оснований в ДНК. Однако для большинства полос в области $1400 - 600 \text{ см}^{-1}$ его можно рассматривать лишь как условное. Результаты сведены в табл. 2. Анализ данных табл. 2 позволяет выявить

некоторые закономерности. Так, положение полосы связи $C=N$ в спектре ДНК очень близко к положению соответствующих полос в спектрах индивидуальных оснований. Частоты колебаний связей $C=C$ в спектре ДНК, и свободных — гуанина и аденина практически одинаковы, а в спектрах свободных пиримидинов несколько выше. Однако причины такого эффекта пока не ясны. Полосы плоских деформационных колебаний NH_2 - и NH -групп оснований в спектре ДНК сдвинуты в сторону низких частот по сравнению с соответствующими полосами свободных оснований, что, как и в случае $C=O$ -групп, может быть обусловлено участием атомов водорода NH_2 - и NH -групп в водородных связях. В остальных областях спектра частоты колебаний оснований в составе нуклеиновых кислот совпадают с частотами колебаний свободных оснований в ожидаемых пределах.

Фритцше^{21, 22}, изучая ИК-спектры образцов ДНК с различным составом оснований в области $1800-1200\text{ см}^{-1}$, обнаружил количественную линейную зависимость между отношением интенсивностей полос 1505 и 1485 см^{-1} , характерных для поглощения гуанина и аденина соответственно, с процентным содержанием ГЦ пар (рис. 9). Автор этих работ предложил использовать ИК-спектры ДНК в аналитических целях — для определения содержания пар ГЦ. Развивая исследования в этом направлении, Тзубон с сотр.²³ измеряли ИК-спектры ДНК из различных видов бактерий с разным соотношением пар оснований ЦГ (гуанин — цитозин) и АТ (аденин — тимин) и обнаружили корреляцию между содержанием ГЦ и АТ пар и интенсивностью большинства полос спектра. На основании этих данных авторы нашли спектральные характеристики наличия АТ и ГЦ пар оснований в ДНК, приведенные в табл. 7.

Итак, в ИК-спектре ДНК действительно наблюдаются смещения частот некоторых полос по сравнению с их частотами в спектрах свободных оснований, а также имеется ряд полос, характерных для АТ и ГЦ пар оснований.

3. Влияние рН на спектры оснований

Основания нуклеиновых кислот могут существовать в различных ионных формах, поскольку в их молекулах имеется несколько возможных мест присоединения протона. Однако практически наблюдается сравнительно мало таутомерных форм из-за того, что протонизация в ряде случаев энергетически невыгодна. Одним из способов определения места присоединения или отрыва протона является ИК-спектроскопия ионных форм оснований.

Выяснению этого вопроса посвящены работы Сухорукова^{30, 32, 33, 119} и Анжела²⁹ (твердая фаза), Тзубон и Шиманоучи^{10, 31} (твердая фаза и D_2O растворы) и Синсхаймера с сотр.³⁵ (D_2O растворы). В результате этих исследований показано, что для всех оснований нуклеиновых кислот образование катионов сопровождается сдвигом колебаний двойных связей к более высоким частотам, а образование аниона — к более низким частотам как в ИК-, так и в КР-спектрах^{31-33, 53}.

ИК-спектр цитидина ($pK=4,5$)¹²⁰ в кислой среде значительно отличается от его спектров в нейтральной и щелочной средах (рис. 10).

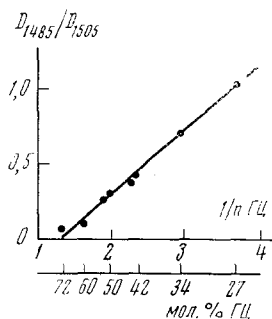


Рис. 9. Зависимость отношения оптических плотностей полос 1485 и 1505 см^{-1} дейтерированных пленок ДНК от $1/n_{ГЦ}$, где $n_{ГЦ}$ — мольная доля пар ГЦ в составе ДНК²²

ТАБЛИЦА 7

Полосы поглощения оснований ДНК (92% отн. вл.)

ГЦ-пары	ГЦ-дейтер	АТ-пары	АТ-дейтер.
1705 с	1676 с	1705 с	1687 с
	1648 с		1659 с
1609 ср	1623 ср	1636 ср	1638 ср
1576 сл	1576 с	1605 ср	1618 с
	1557 ср	1574 сл	1571 ср
	1537 сл		
1528 ср	1523 сл		
1493 ср	1501 ср	1503 сл	1516 сл
		1477 ср	1476 ср
1456 сл	1453 сл	1450 ср	1458 сл
1444 сл	1439 сл		
1414 сл			
1380 ср	1377 сл	1375 сл	1375 сл
1331 сл	1350 сл	1331 сл	1334 сл
1296 ср	1302 сл	1292 сл	1300 сл
		1276 сл	1153 сл
		932 ср	
893 ср		888 ср	
860 сл	851 сл		
	831 ср	831 ср	834 ср
	797 сл	795 сл	794 сл
778 ср	778 с	763 сл	773 ср
	727 сл	722 сл	715 сл
	698 сл		

Спектр протонированного цитозина характеризуется увеличением частот колебаний связей $\text{C}=\text{O}$ с 1655 до 1680 см^{-1} и NH_2 -группы с 1667 до 1725 см^{-1} . Протонирование цитозина имеет два возможных направления: по аминогруппе и по N_1 атому кольца. Смещение полос поглощения кратных связей в высокочастотную область указывает на увеличение кратности связей $\text{C}=\text{O}$ и $\text{C}=\text{N}$, что более вероятно из-за потери сопряжения в случае присоединения протона к атому N_1 , а не к аминогруппе. Аналогичный сдвиг частот колебаний двойных связей кольца наблюдается при протонировании пиридина $\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+$, но не анилина ($\text{C}_6\text{H}_5 - \text{NH}_3^+$)^{10, 31, 32}.

В ИК-спектре урацила в щелочной среде ($\text{pK}=9,5$) наблюдается снижение интенсивности полосы валентных колебаний NH -связей и уменьшение частоты валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ -групп (с 1680 до 1638 см^{-1}), что обусловлено отрывом протона от N_1 или N_3 атома кольца и делокализацией электрона по системе сопряженных двойных связей^{31, 32}. Эмпирическая зависимость между частотой валентных колебаний карбонильной группы и потенциалом ионизации I ¹¹⁶:

$$\nu_{\text{C}=\text{O}} = 29,2 I + 1409$$

дает для частот 1670 и 1735 см^{-1} значения потенциала ионизации, равные 9 и 11 эв соответственно; в ионной форме урацила потенциал ионизации снижается до 7,8 эв³³, однако все данные нуждаются в проверке независимыми методами.

В сильно щелочном растворе тимина ($\text{pK}=9,8$) происходит енолизация одной из карбонильных групп и исчезновение соответствующей по-

лосы в его ИК-спектре. Остальные полосы смещаются к низким частотам (полосы 1735, 1670, 1640 и 1570 см^{-1} в нейтральной среде и 1650, 1600, 1580 см^{-1} в щелочной среде) ^{14, 98}.

Образование аниона аденина в щелочной среде ($pK_2=9,8$) сопровождается исчезновением полосы связи N_9H в его ИК-спектре, что однозначно указывает место отрыва протона от имидазольного кольца аденина ^{29, 32}. В ИК-спектре протонированного аденина ($pK_1=4,1$) как в

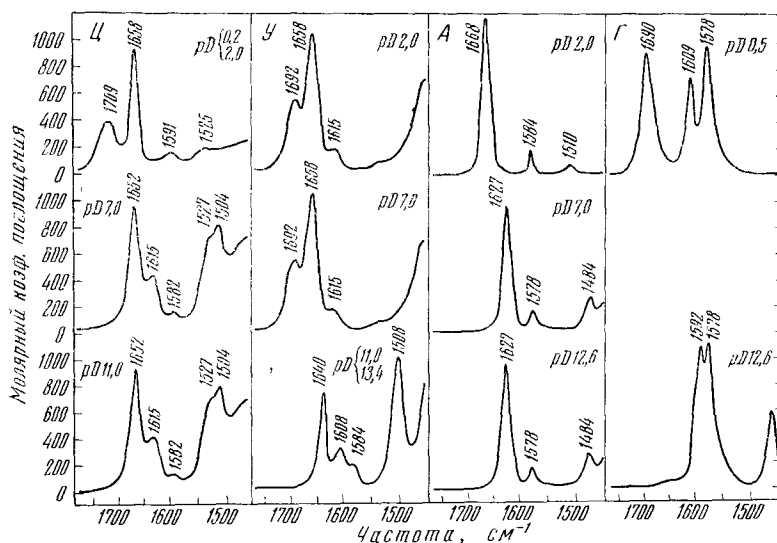


Рис. 10. ИК-спектры D_2O растворов нуклеозидов при различных рН ^{31, 100}

твердой фазе, так и в растворе повышаются частоты колебаний кольца, в том числе колебаний связи $N_1=C_6$ (с 1626 до 1668 см^{-1} в D_2O растворе) ³². Это более вероятно происходит в результате присоединения протона по атому N_1 кольца, чем по аминогруппе. Действительно, методом дифракции рентгеновских лучей показано, что в кристаллическом гидроклориде аденина протон локализован на атоме N_1 кольца ¹²¹.

Протонирование гуанина ($pK_1=1,6$) сопровождается, как и в случае остальных оснований, общим сдвигом полос поглощения в области 1700—1400 см^{-1} в сторону более высоких частот, в том числе полосы деформационных колебаний NH_2 -группы с 1681 до 1718 см^{-1} , и напоминает сдвиг частот при протонировании пиридина (рис. 10) ^{12, 13, 31, 32, 101}. Согласно данным кристаллографического метода ⁷⁵ и метода ЯМР ¹²², а также расчетам Пульмана ¹²³, протонирование гуанина идет по N_7 атому кольца, и данные ИК-спектроскопии ^{31, 101, 124} этому не противоречат. Смещение рН в щелочную область понижает интенсивность полосы поглощения карбонильной группы гуанина ($pK_2=9,4$) и дает новые полосы поглощения с частотами 1638 и 1413 см^{-1} ^{31, 101}. Спектр щелочного раствора гуанина имеет сходство со спектром 2-амино-6-метоксипурина. По-видимому, эти изменения в ИК-спектре гуанина вызваны отрывом протона и перераспределением заряда, приводящим к уменьшению кратности связи $C=O$ и увеличению электронной плотности на атоме кислорода гуанина ³¹.

Пуриновые и пиримидиновые основания могут существовать в растворе в различных таутомерных формах, причем доминирующей может быть форма иная, чем в твердой фазе. В работах Майлза с сотр. ^{31, 97-101, 103} этот вопрос решается путем сравнения ИК-спектров

D_2O растворов оснований с ИК-спектрами растворов модельных соединений, закрепляющих определенный структурный элемент. Например, модельными соединениями для цитозина служили N-диметилцитозин и 1-метил-2-кетопиримидин, для гуанина — 1,9-диметилгуанин и 2-амино-6-метоксипурин. Таким образом, было показано, что в растворе цитозина и гуанина преобладает amino-кето-форма, в растворе аденина — amino-форма, а в растворах урацила и тимина — дикето-форма, что подтверждается методом ЯМР¹²⁵.

Итак, изучение спектральных изменений в ИК-области при смещениях рН среды дает возможность определить место отрыва или присоединения протона в пуриновых и пиримидиновых основаниях. Измерение ИК-спектров растворов оснований позволяет также установить преобладающую таутомерную форму основания.

У. ИЗУЧЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ИХ ИК-СПЕКТРАМ

Согласно модели Уотсона и Крика^{4, 5}, вторичная структура ДНК представляет собой двойную спираль с антипараллельными цепочками, устойчивую в кристаллическом состоянии и в растворе^{126, 127}, которая стабилизируется как водородными связями, так и силами Ван-дер-Ваальса. Разрушение спирали ДНК и расхождение ее цепей (денатурация) происходит как при нагревании, так и под действием кислот и щелочей.

Изучение вторичной структуры ДНК и РНК — важная задача молекулярной биологии. При исследовании вторичной структуры нуклеиновых кислот в кристаллическом состоянии рентгенографический метод играет пока главную, а ИК-спектроскопия — вспомогательную роль. Однако при изучении структуры ДНК и РНК в растворах метод ИКС имеет ряд преимуществ и дает важные сведения наряду с другими методами — гидродинамическими, оптическими, рассеянием рентгеновских лучей под малыми углами^{126–129}.

В ИК-спектрах нативной ДНК (в растворе или в пленке) найдена интенсивная полоса поглощения, характерная для ее вторичной структуры, и локализованная при 1705 см^{-1} для легкой и при 1685 см^{-1} для дейтерированной формы ДНК^{15, 20, 23, 38, 37, 130}. Эта полоса при денатурации смещается к меньшим частотам, например, с 1685 к 1660 см^{-1} . Характерность полосы 1705 (1685) см^{-1} для вторичной структуры ДНК подтверждается при изучении влияния температуры на ее интенсивность. Кривая изменения относительной интенсивности полос 1662 и 1682 см^{-1} с температурой (рис. 11) напоминает кривую «плавления» ДНК при измерении поглощения в области 260 нм в УФ-спектре^{20, 39}. В работе¹³¹ показано, что температурная зависимость интенсивности максимумов разностных спектров D_2O растворов ДНК, соответствующих полосам поглощения ДНК в области $1700\text{—}1550\text{ см}^{-1}$, также совпадает с кривой «плавления». Это дает возможность следить за термическим переходом «спираль — клубок» по колебательным спектрам растворов ДНК и достаточно точно определять ее температуру плавления $T_{пл.}$ и ширину перехода $\Delta T_{пл.}$ При этом метод ИК-спектроскопии в отличие от измерений $T_{пл.}$ по УФ-спектру или по измерению вязкости раствора ДНК, дает возможность определять температуру плавления для концентрированных и гелеобразных растворов ДНК.

Сейчас еще не ясно, почему указанные полосы чувствительны к изменению вторичной структуры ДНК: то ли вследствие изменения взаимодействия двух цепей, то ли вследствие нарушения регулярности. Однако практическая полезность таких данных несомненна.

Классические рентгенографические исследования кристаллических образцов ДНК^{58, 59, 132} показали, что спираль ДНК может иметь различные конформации в зависимости от степени гидратации. Na-соль ДНК может существовать в В-форме, устойчивой при отн. вл. выше 92%, и в А-форме, устойчивой при 75% отн. вл.^{58, 59, 132}. Li-соль ДНК также имеет две конформации: В-форму при отн. вл. выше 66% и С-форму в интервале 44—66% отн. вл.¹³⁹. Дальнейшее уменьшение содержания воды приводит к постепенному разупорядочению структуры ДНК. Эти конформации спирали ДНК отличаются друг от друга своими параметрами и ориентацией оснований.

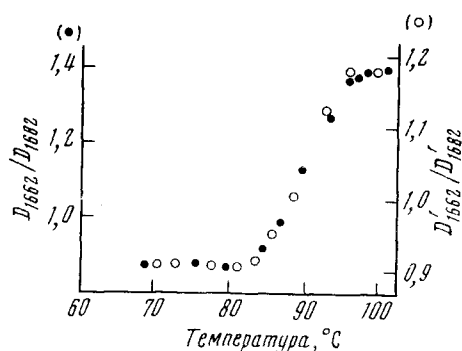


Рис. 11

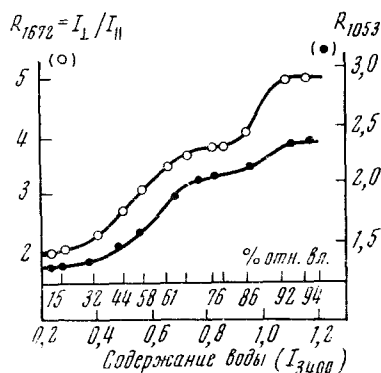


Рис. 12

Рис. 11. Отношение оптических плотностей полос 1662 и 1682 см^{-1} D_2O раствора ДНК как функция температуры. 10 мг/мл ДНК в 0,15 М КСl²⁰

Рис. 12. Зависимость величин дихроичного отношения R_{1672} и R_{1053} от содержания воды в ориентированных пленках ДНК¹⁸

Изучение ИК-спектров ДНК подтвердило и расширило данные рентгеноструктурного анализа о конформационных переходах ДНК. В работе Бредбери и сотр.¹⁸ исследована зависимость поляризации ряда полос поглощения от относительной влажности ориентированных образцов Na- и Li-соли ДНК. Для Na-соли ДНК обнаружено постоянство значений дихроичного отношения (R) полос 1672 и 1053 см^{-1} в интервалах отн. вл., соответствующих устойчивости В- и А-форм ДНК, а именно — выше 90% и между 80 и 70% отн. вл. (рис. 12). Для Li-соли ДНК такие плато обнаружены на кривой зависимости R_{1670} от отн. вл. в других интервалах: выше 66% и между 56 и 44% соответственно ее В- и С-формам. В работах^{18, 134} показано, что для каждой конформации Na-соли ДНК характерна своя частота антисимметричных колебаний фосфатных групп (два плато на кривой зависимости частоты этой полосы от отн. вл.).

В работах Сезерленда и Тзубои¹⁷ и Фалька с сотр.¹⁹, проводивших аналогичные исследования, также обнаружено увеличение дихроичного отношения полос поглощения колец оснований Na-соли ДНК при повышении содержания воды в образце, однако кривые имеют иной характер, не дающий четкого доказательства взаимного перехода А- и В-форм ДНК. И все же эти результаты свидетельствуют о том, что упорядоченная спиральная структура ДНК зависит от количества адсорбированной воды и что частичная дегидратация приводит к значительной дезорганизации молекулярной структуры ДНК.

Совсем недавно Веббу и Басеру методом ИКС удалось найти структурные особенности опухолевой ДНК, выделенной из тканей саркомы

Рауса и карциномы молочной железы мышей¹³⁵. Они обнаружили, что ДНК опухолевых тканей менее гидратирована при высоких и более гидратирована при низких значениях отн. вл., чем ДНК нормальных тканей, и что дихроичное отношение опухолевой ДНК, меньшее, чем R нормальной ДНК, остается постоянным в интервале 92—45% отн. вл. Авторы интерпретируют данные ИК-спектров как свидетельство того, что структура ДНК опухолевых тканей промежуточна между В- и А-формами ДНК и не изменяется при умеренных степенях дегидратации.

Изучение колебательных спектров ДНК в поляризованном излучении дает сведения об ориентации ее структурных элементов. Так, знание величин дихроичного отношения полосы 1670 см^{-1} при 92 и 75% отн. вл. позволяет определить ориентацию плоскостей оснований А-формы ДНК на основании предположения, что для В-формы они перпендикулярны оси спирали. Результаты таких расчетов показывают, что в А-форме ДНК плоскости оснований отклонены от перпендикуляра на $13\text{--}15^\circ$ ^{17, 18}. Измерение дихроизма полос поглощения 1220 и 1089 см^{-1} позволяет вычислить также ориентацию фосфатных групп, поскольку известно, что момент перехода их антисимметричных колебаний направлен вдоль линии O^-O , а симметричных — вдоль биссектрисы угла ORO . Согласно данным работ^{17, 18}, как в А, так и в В-форме ДНК, линия O^-O наклонена к оси спирали на $50\text{--}60^\circ$, а биссектриса угла ORO перпендикулярна оси молекулы. Однако это заключение справедливо лишь в случае высокой характеристичности колебаний по форме. Но так как колебания фосфатной группы наверняка сильно смешаны с другими колебаниями скелета, значения углов ориентации этой группы в ДНК можно принять лишь как приблизительные. Найденная экспериментально ориентация PO_2 -групп ДНК противоречит модели Уотсона — Крика^{4, 5}, согласно которой в В-форме ДНК линия O^-O перпендикулярна оси спирали, а биссектриса угла ORO почти параллельна ей.

При исследовании процессов гидратации макромолекул ДНК важно выяснить последовательность гидратации структурных элементов ДНК (оснований, дезоксирибозы и фосфатных групп), что можно сделать с помощью ИК-спектров, так как изменение отн. вл. сопровождается сдвигами полос поглощения этих элементов. Так, повышение отн. вл. от 0 до 92% вызывает смещение полосы карбонильных групп оснований ДНК с 1705 до 1715 см^{-1} , полосы PO_2 -групп с 1240 до 1220 см^{-1} , полосы $\text{C}=\text{O}$ -связи дезоксирибозы с 1066 до 1053 см^{-1} ^{17, 19}. Изучая зависимость спектральных сдвигов от влажности образца ДНК, Фальк, Хартман и Лорд¹⁹ установили, что в интервале 0—66% отн. вл. гидратируются фосфатные группы ДНК (6 молекул воды на фосфатную группу при 66% отн. вл.), выше 66% отн. вл. начинается гидратация оснований ДНК. Зависимость между переходом А-формы в В-форму от особенностей адсорбции воды выяснить еще не удалось. Положение полос поглощения воды в ИК-спектре ДНК свидетельствует о том, что все слои адсорбированной воды, кроме первого слоя, имеют структуру, подобную структуре жидкой воды^{19, 137}. Поэтому количество воды, адсорбированное пленкой ДНК, можно вычислить из интенсивности полосы 3400 см^{-1} , принимая ее коэффициент молярной экстинкции (ϵ) равным ϵ жидкой воды.

Вторичная структура РНК исследована значительно меньше, чем структура ДНК, поскольку РНК плохо кристаллизуется и дает рентгенограммы низкого качества. И все же рентгеноструктурным и другими методами установлено, что молекулы РНК являются одноцепочечными, закрученными вокруг себя с чередованием спирализованных и неспирализованных участков^{129, 137}. Доля спаренных оснований А—У и Г—Ц

различна для разных видов РНК. В ИК-спектрах пленок РНК, как и в спектрах ДНК, наблюдается полоса 1705 см^{-1} (1680 см^{-1} в D_2O), свидетельствующая о наличии спаренных оснований в цепочке РНК³⁸. Изменение интенсивности этой полосы при повышении температуры от 22 до 90° представляет собой пологую кривую, напоминающую кривую плавления РНК в УФ-области спектра³⁹. Метод ИК-спектроскопии успешно применяется для определения вторичной структуры молекул РНК. В настоящее время найдено относительное количество пар А—У и Г—Ц путем сравнения наблюдаемых и рассчитанных ИК-спектров для пяти транспортных РНК: аланиновой, валиновой, метиониновой, формилметиониновой и тирозиновой^{41, 138, 139} по методу Томаса¹⁰², а также для рибосомной РНК *E. coli* по методу Коттера и Гратцера^{42, 43}. Оба метода расчета основаны на том, что поглощение оснований, связанных Н-связями, отличается от поглощения свободных оснований, и на предположении, что дисперсионное взаимодействие оснований в вертикальных «стопках» не оказывает влияния на спектр, хотя последнее противоречит данным Малеева с сотр.¹⁴⁰ Метод Томаса состоит в вычислении спектра РНК на основании предположения, что поглощение РНК аддитивно складывается из поглощения пар А—У и Г—Ц и четырех неспаренных оснований. Суммарный спектр РНК вычисляют на основании спектров поглощения четырех нуклеотидов и двух спиральных полинуклеотидов: поли-(А+У) и поли-(Г+Ц). Метод Коттера и Гратцера заключается в вычислении разностного спектра РНК (против диализата) с помощью аналогичных спектров поли-(А+У) и поли-(Г+Ц), которые учитывают вклад только спаренных оснований. Последний метод имеет преимущество перед методом Томаса, которое состоит в большей простоте вычисления спектров, поскольку это анализ двух-, а не шестикомпонентной системы.

Данные о вторичной структуре РНК, полученные на основании ИК-спектров, согласуются с данными других методов, например метода дисперсии оптического вращения, УФ-спектроскопии, кислотно-щелочного титрования и с предложенной Дьюбом¹⁴¹ моделью транспортных РНК типа «клеверный лист».

РНК вируса карликового риса имеет вторичную структуру, подобную структуре ДНК, как показано методом дифракции рентгеновских лучей. Однако ИК-спектр этой РНК проявляет более слабую поляризацию, чем спектр ДНК (рис. 5)²⁷. Полосы плоских колебаний оснований, как и в спектре ДНК, поляризованы перпендикулярно направлению ориентации, а поляризация полос поглощения фосфатных групп РНК и ДНК различна, и, следовательно, различна ориентация PO_2^- -групп. В спирали РНК вируса риса линия $\text{O}^{\cdots}\text{O}$ составляет с осью угол 70° , а биссектриса угла OPO — угол 40° (см. табл. 8).

ИК-спектр гибрида ДНК—РНК содержит интенсивные полосы поглощения, характерные как для ДНК, так и для РНК¹⁴². Дихроизм полос поглощения фосфатных групп свидетельствует о том, что ориентация

ТАБЛИЦА 8

Двойная спираль	Полоса 1220 см^{-1}		Полоса 1085 см^{-1}	
	дихроизм	θ , град*	дихроизм	θ , град*
ДНК	Нет	55	⊥	65
РНК	⊥	70	⊥	40
Гибрид ДНК—РНК	⊥	68—78	Нет	53—57

* θ —угол между осью спирали и линией $\text{O}^{\cdots}\text{O}$ для полосы 1220 см^{-1} ; угол между осью спирали и биссектрисой угла OPO для полосы 1085 см^{-1} .

этих групп по отношению к оси спирали гибрида не полностью тождественна их ориентации ни в двуспиральной ДНК, ни в двуспиральной РНК. Авторы¹⁴² предполагают, что наблюдаемый дихроизм можно объяснить тем, что в молекуле гибрида группы PO_2^- цепочки ДНК сохраняют ту же ориентацию, что и в двуспиральной ДНК, а в цепочке РНК — как в двуспиральной РНК.

Известно, что молекулы ДНК образуют нуклеопротеидные комплексы с гистонами, а также с полипептидами, например, с поли-*L*-лизином. Информация о структуре ДНК и гистона в составе ДНП (дезоксинуклеопротеида) важна для определения структуры хромосом. Спектр пленки ДНП в области $3500\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ более сходен со спектром гистона, чем ДНК, поскольку полосы белка интенсивнее полос ДНК. В области ниже 1400 см^{-1} спектр нуклеопротеида идентичен спектру ДНК¹⁴³. Гистон, входящий в состав ДНП, имеет интенсивную полосу с частотой 3300 см^{-1} (валентные колебания NH -связей), полосу Амид I при 1660 см^{-1} (валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ -групп), и полосу Амид II при 1545 см^{-1} (деформационные колебания NH -групп), а также слабые полосы с частотами 1450, 1400 и 1320 см^{-1} ¹⁴⁴. Полосы поглощения гистона слабо поляризованы даже при высоких влажностях. Исследования ИК-спектра, а также дисперсии оптического вращения ДНП в обычном и дейтерированном состояниях показали, что в ДНП часть белка (50%) находится в α -спиральной форме, причем конформация белка изменяется во времени. Измерение дихроизма полос поглощения ДНК при высоких отн. вл. пленок ДНП свидетельствует о том, что ДНК в составе нуклеогистона находится в В-кристаллической форме, что согласуется с рентгенографическими данными¹³⁴.

Стехиометрический комплекс ДНК с поли-*L*-лизином представляет собой волокна, дающие четкие рентгенограммы, которые при отн. вл. 75 и 66% сходны с рентгенограммой В-формы ДНК¹⁴⁵. ИК-спектр этого комплекса, в общих чертах подобный спектру ДНП, обнаруживает при понижении отн. вл. до 0% лишь незначительное смещение полосы фосфатных групп (с 1224 до 1233 см^{-1}) по сравнению с ее смещением в ДНК (с 1225 до 1240 см^{-1}).

В комплексе ДНК — гистон этот сдвиг несколько больше по сравнению с комплексом ДНК — полилизин.

Авторы рассматривают сдвиг этой полосы при дегидратации ДНК как следствие освобождения фосфатных групп от водородных связей. С этой точки зрения незначительный сдвиг полосы асимметричных колебаний PO_2^- -групп при дегидратации комплекса ДНК — полилизин может означать, что в этом комплексе существуют водородные связи между PO_2^- -группами ДНК и NH_3^+ -группами боковых цепей полилизина. Однако детали молекулярного окружения фосфатных групп не выяснены, поэтому такую интерпретацию нельзя считать бесспорной.

VI. ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ИКС ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕЖДУ СОБОЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Взаимодействие комплементарных оснований нуклеиновых кислот посредством водородных связей, постулированной Уотсоном и Криком в 1953 г.⁵, является фундаментальным в биологических системах. Как известно, линейная последовательность нуклеотидов в молекулах ДНК хранит генетическую информацию клетки (триплетный код). Важным процессом в считывании и распространении этой информации является

образование комплементарных структур с помощью специфических Н-связей. Предполагают, что подобный тип взаимодействия имеет место тогда, когда ДНК управляет синтезом РНК, а также при взаимодействии нуклеиновых кислот во время синтеза белка. Поэтому необходимо найти физические и химические критерии специфичности и стабильности спаривания оснований в спиральных нуклеиновых кислотах, и эта задача успешно решается методом ИК-спектроскопии.

Образование ассоциатов в водных растворах пуринов и пиримидинов обнаружено методом измерения концентрационной зависимости давления водяных паров над ними^{146, 147}, а также хроматографическим методом путем ковалентного нанесения одного из оснований на колонку и элюирования раствором другого основания^{148, 149}. Однако, как показано методом ЯМР, в водных растворах ассоциаты оснований могут образовываться как посредством Н-связей, так и за счет взаимодействия π -электронов гетероциклических колец и образования вертикальных «стопок» оснований^{150, 151}. Метод комбинационного рассеяния, напротив, дал отрицательные результаты относительно образования Н-связей между комплементарными основаниями в водных растворах¹⁵². В воде очень велик эффект гидратации, т. е. образования Н-связей между водой и растворенными веществами, чтобы можно было изучать взаимодействие последних.

Методом ИКС удалось показать возникновение Н-связей между комплементарными основаниями нуклеиновых кислот сначала в твердой фазе для смешанных кристаллов оснований. В ИК-спектре смешанного кристалла аденозина и уридина была обнаружена новая полоса поглощения с частотой 1710 см^{-1} , а в спектре кристалла гуанозина и цитидина — полоса 1720 см^{-1} , отсутствующие в спектрах компонентов^{41, 153}. Автору работы¹⁵⁴ не удалось воспроизвести эти результаты, но метод дифракции рентгеновских лучей подтвердил наличие Н-связей в смешанных кристаллах А—У и Г—Ц^{155–170}. Эти наблюдения принципиально важны потому, что они открыли возможность определения отношения специфических пар оснований по ИК-спектрам.

Исследование Н-связывания оснований нуклеиновых кислот в растворе в чистом виде удобно в неполярных растворителях типа CCl_4 или слабо полярных типа хлороформа, образующих слабые Н-связи с растворенными веществами и исключаящих гидрофобное и электростатическое взаимодействие оснований, а следовательно, образование вертикальных «стопок»^{161–165}. Изучение взаимодействия оснований в неводных растворителях важно еще и потому, что оно может быть сходным с взаимодействием оснований внутри двойной спирали ДНК, где основания почти не контактируют с молекулами воды. Такие исследования стали возможны благодаря синтезу N-производных оснований и замещенных по сахару нуклеозидов, растворимых в органических средах.

Взаимодействие оснований в растворе можно изучать по ИК-спектрам в области $3500\text{—}2800\text{ см}^{-1}$, поскольку частоты валентных колебаний NH_2 - и NH -групп сдвигаются при образовании Н-связей. Образование ассоциатов оснований сопровождается уменьшением интенсивности полос свободных и проявлением серии новых полос связанных NH - и NH_2 -групп (табл. 9). По этим спектральным изменениям была обнаружена самоассоциация оснований в довольно концентрированных (10^{-2} М) растворах и ассоциация в смешанных разбавленных (10^{-4} М) растворах комплементарных оснований нуклеиновых кислот^{161–166} (см. рис. 13). Метод ИКС дал прямое доказательство гомо- и гетероассоциации пуринов и пиримидинов посредством Н-связей. Он позволил также обнаружить специфичность этого взаимодействия, поскольку из всех возможных

ТАБЛИЦА 9

Частоты колебаний свободных NH-групп оснований и связанных NH-групп в гомо- и гетероассоциатах

Соединение	$\tilde{\nu}_{\text{NH}}$ свободных, см^{-1}	$\tilde{\nu}$ самоассоц., см^{-1}	$\tilde{\nu}$ гетероассоц., см^{-1}
Аденин	3530—3527 3415	3485, 3250 3312, 3200	3490 3330
Урацил	3400—3395	3210—3185 3110, 3050	3260 2800
Гуанин	3515—3510 3408	3480, 3305 3355	3490
Цитозин	3531, 3418	3485 3320	3472

комбинаций четырех оснований наиболее прочными оказались ассоциаты Г—Ц и А—У (А—Т), причем комплекс Г—Ц прочнее комплекса А—У, вероятно, за счет трех водородных связей. Эти результаты полностью подтверждаются исследованиями ассоциации оснований и нуклеозидов методом ЯМР ^{168, 169}.

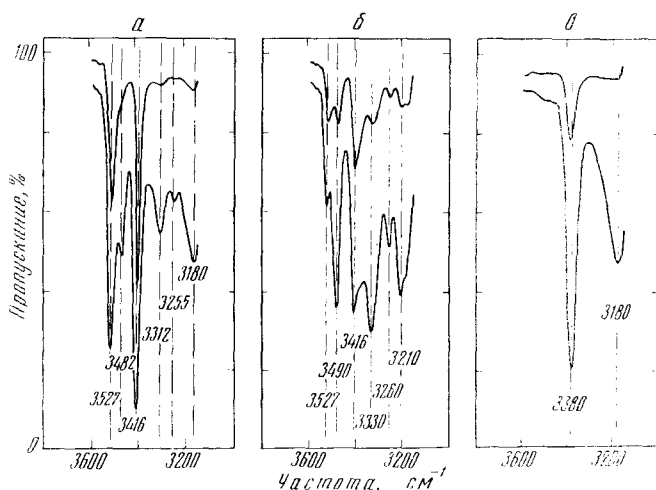


Рис. 13. ИК-спектры растворов в CDCl_3 9-этиладенаина (а), 5-Вг урацила (б) и их смеси 1:1 (в); верхние кривые — 0,019 М; нижние кривые — 0,077 М

В ряде работ ^{163, 170–173} по концентрационной зависимости интенсивности полос NH-групп мономеров получены значения констант самоассоциации и гетероассоциации различных оснований (табл. 10). Данные, полученные разными авторами для ассоциации в хлороформе, удовлетворительно согласуются друг с другом, а завышенные значения констант, полученные в работе ¹⁶³, связаны, по-видимому, с использованием четыреххлористого углерода в качестве растворителя (см. также работу ¹⁷²). Значения констант подтверждают, что ассоциация аденина с урацилом, а особенно гуанина с цитозином значительно сильнее самоассоциации этих оснований.

Из температурной зависимости констант ассоциации вычислены термодинамические параметры ассоциации оснований в разных растворите-

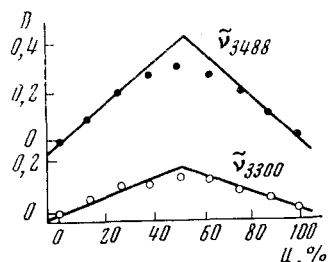
ТАБЛИЦА 10

Значение констант ассоциации различных оснований

Ассоциат	Растворитель	Константа ас., M^{-1}	Т-ра, $^{\circ}C$	ΔH , ккал/моль	Ссылки на литературу
А—А	$CHCl_3$	13 ± 2	25	$1,3 \pm 0,1$	173
	$CDCl_3$	$3,4 \pm 0,3$	25	$4,0 \pm 0,8$	170
	CCl_4	83 ± 7	20		163
У—У	$CHCl_3$	$11,6 \pm 2,0$	25		172
	$CHCl_3$	19 ± 4	25	2,0	173
	$CDCl_3$	$6,1 \pm 0,6$	25	$4,3 \pm 0,4$	170
	$CDCl_3$	10 ± 1	25	$4,9 \pm 0,2$	171
	CCl_4	115 ± 8	20		163
А—У	$CHCl_3$	$1 \cdot 10^2$	25	$6,2 \pm 0,3$	173
	$CDCl_3$	$1 \cdot 10^2$	25		175
	$CDCl_3$	$1,4 \cdot 10^2$	25	$6,2 \pm 0,1$	170
	$CDCl_3$	$1,5 \cdot 10^2$	25		167
	CCl_4	$6 \cdot 10^2$	20		163
Г—Ц	$CHCl_3$	10^5	30		164

лях. Эти данные приведены в табл. 10. Как видно из табл. 10, величины теплот образования ассоциатов в 2—3 раза превышают теплоту образования водородной связи типа $H \cdots O=C$ ¹⁷⁴, что, возможно, связано с циклической структурой этих комплексов.

Рис. 14. Зависимость оптической плотности полос ассоциатов 3300 и 3488 cm^{-1} от процентного содержания цитозина в смеси производных гуанина и цитозина (суммарная концентрация $1,6 \cdot 10^{-3} M$) ¹⁶²



Расчеты констант ассоциации во всех указанных работах проводили на основании предположения о димерной ассоциации оснований, в пользу которого свидетельствует тот факт, что интенсивность поглощения всех линий гетероассоциатов при постоянной суммарной концентрации компонентов и изменении их соотношения имеет максимум при соотношении концентраций 1:1 ^{161–164, 167, 170} (рис. 14). В работе ¹⁶³ это доказано путем определения степени ассоциации (n) по зависимости концентрации ассоциата от концентрации мономера. Для ассоциации аденина с урацилом в их эквимольной смеси и для самоассоциации аденина и урацила было получено значение n , равное 2, во всех случаях. Данные ИКС подтверждены также криоскопическим методом.

Другим аргументом в пользу димеризации оснований служит постоянство отношения интенсивностей свободных NH -групп урацила и NH_2 -групп аденина в смеси А+У при изменении концентрации компонентов ¹⁶⁴. Величины теплот образования димеров, составляющие 4—6 ккал/моль, свидетельствуют о возможности циклической структуры, удерживаемой двумя водородными связями. Дифракция рентгеновских лучей показала, что в кристаллическом состоянии димеры А—У и Г—Ц имеют циклическую структуру ^{155, 158}.

Авторы большинства работ по изучению специфического спаривания оснований нуклеиновых кислот высказывают предположение о преобладании в растворе одной из нескольких возможных циклических структур димеров, хотя реально существующую структуру установить пока никому не удалось. Однако в работе¹⁷² подвергается сомнению образование димеров только одного сорта на основании следующих фактов. Во-первых, при димеризации оснований в ИК-спектрах появляется больше новых линий, чем можно было ожидать для димеров одного типа. Во-вторых, вычисление констант ассоциации по линиям мономеров и димеров приводит к различным результатам. Авторы данной работы считают, что результаты можно объяснить образованием либо димеров разного сорта, либо тримеров типа $A+2U$. На возможность образования тримеров в растворе аденина и смеси аденина и урацила указывают данные ЯМР^{168, 176}.

При исследовании влияния различных заместителей (CH_3 , SH^- , Br , I) на степень ассоциации урацила с аденином было обнаружено, что заместители, уменьшающие значение $pK_{асс}$ урацила или увеличивающие электронную плотность в положении N_7 -аденина, усиливают их способность к ассоциации. Так, комплексы 2,6-диаминопурина с урацилом и $5Br$ -урацила с аденином наиболее прочны. Замещение же атомов H в аминогруппе аденина снижает его константу ассоциации, например 6-диметиламинопурин совершенно неспособен к ассоциации¹⁷⁵.

Майлз с сотр.^{47-49, 52, 99} применили метод ИК-спектроскопии для изучения различных структурных комплексов синтетических полинуклеотидов в растворе. Известно, что в растворе полицитиловая (или 5-бромцитидиловая) и полиинозиновая кислоты взаимодействуют, образуя спираль со структурой, подобной спирали ДНК, а полиуридиловая и полиадениловая кислоты образуют двух- или трехтяжную спираль в зависимости от условий эксперимента^{6, 45, 177-181}. Образование спиральных комплексов при взаимодействии полинуклеотидов сопровождается большими и характеристическими изменениями в ИК-спектрах вследствие образования водородных связей и изменения химического окружения оснований (рис. 15). Колебания карбонильных групп сдвигаются при этом, как и в случае ДНК, в высокочастотную область. При образовании двойной спирали поли-($A+U$) в ИК-спектре этого комплекса наблюдается сдвиг полосы карбонильных групп с 1660 к 1672 см^{-1} ^{49, 99, 154}. В спектре раствора спирального комплекса поли-($I+2C$) наблюдается сдвиг полосы поглощения поли- I с 1678 к 1697 см^{-1} и уменьшение интенсивности полосы 1651 см^{-1} поли- C ^{47, 49, 50, 154}. В спектре двойной спирали полиадениловой кислоты наблюдается полоса 1710 см^{-1} , характерная для вторичной структуры двойных спиралей. Аналогичное повышение частоты колебаний карбонильной группы гуанина с 1666 до 1680 см^{-1} происходит при образовании спиралей гуаниловых ($3'$ и $5'$) кислот. Известно, что гуаниловая кислота может образовать устойчивые при пониженных температурах спиралевидные макромолекулярные комплексы¹⁸². В работе⁴⁸ изучали плавление этих спиральных агрегатов в интервале температур $10-60^\circ$ путем измерения интенсивности полосы карбонильных групп.

Образование спиральной вторичной структуры наблюдали по ИК-спектрам не только при взаимодействии комплементарных полинуклеотидов, но и при взаимодействии с полинуклеотидом моно- и олигонуклеотидов, например, гуанозин- $5'$ -фосфата или тримера гуанозинфосфата с поли- C , аденозина с поли- U и т. д.^{51, 52}. ИК-спектры этих комплексов также отличаются от суммы спектров компонентов. Однако эти комплексы устойчивы только при температурах ниже 40°

($T_{\text{пл.}} \sim 40^\circ$). Доказательством специфичности спаривания оснований в комплексах полинуклеотидов с моно- и олигонуклеотидами служит параллельный ход кривых плавления для характеристических частот пуринового и пиримидинового оснований.

В последнее время опубликован ряд работ, посвященных исследованию комплексов нуклеиновых кислот и их компонентов с ионами металлов различными методами, в том числе и методом ИКС^{183–192}. Известно, что под действием ионов металлов изменяются физико-химические свойства нуклеиновых кислот (характеристическая вязкость, скорость седиментации, температура плавления) или происходит их деструкция. Так,

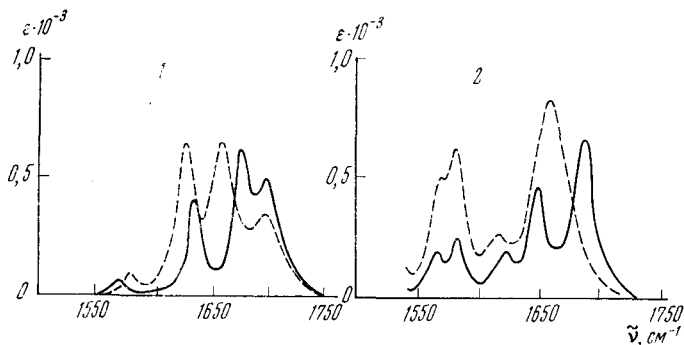


Рис. 15. ИК-спектры D_2O растворов (pD 7,0) комплексов 1 — поли-(А+У), 2 — поли-(Г+Ц), пунктир — сумма спектров соответствующих мононуклеотидов¹⁰²

например, ионы щелочных, щелочно-земельных и переходных металлов повышают температуру плавления ДНК, а ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} ее понижают^{193, 194}.

Ионы металлов могут взаимодействовать с фосфатными группами нуклеиновых кислот по типу ион-ионного взаимодействия или с диполями колец оснований по типу ион-дипольного взаимодействия. Поэтому при изучении комплексов металлов с нуклеиновыми кислотами важно выяснить место связи иона. Методом кондуктометрического титрования показано, что ионы металлов, стабилизирующие структуру ДНК, соединяются с ее фосфатными группами^{195, 196}, а дестабилизирующие ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , а также Ag^+ , Hg^{2+} связываются с основаниями ДНК в местах образования водородных связей, как показано методами ЭПР¹⁹⁷, ЯМР¹⁹⁸ и спектрофотометрии^{193, 199–201}. В соответствии с этими данными обнаружено, что ионы Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} не вызывают, а ионы Ag^+ , Hg^{2+} , Au^{3+} вызывают смещения полос поглощения в ИК-спектрах оснований нуклеиновых кислот^{202–204}.

В ИК-спектре комплекса ДНК — Fe^{2+} обнаружены смещения полос фосфатных групп, но не полос оснований^{203, 204}. Ионы Hg^{2+} и Ag^+ приводят к значительным сдвигам полос в области $1800–1500\text{ см}^{-1}$ ИК-спектров всех оснований нуклеиновых кислот при соотношении ион металла : основание = 2 : 1²⁰² (рис. 16). Спектр комплекса ДНК — Hg^{2+} в области колебаний двойных связей оснований также заметно отличается от спектра ДНК, что свидетельствует о присоединении ионов ртути к основаниям макромолекул^{202, 205, 206}.

Данные ИК-спектроскопии относительно взаимодействия ионов меди с основаниями нуклеиновых кислот весьма противоречивы: одни авторы²⁰⁷ находят сдвиги полос в спектрах некоторых оснований в присутствии ионов Cu^{2+} , а другие авторы²⁰² не обнаруживают таких смещений.

Действительно, как показано в работе Дроздова-Тихомирова и Кикоина²⁰⁸, в спектре поглощения твердого гуанозина и его раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО) с добавками меди положение максимумов в области $1700\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ не изменяется. В спектре твердого гуанозина в присутствии ионов Cu^{2+} наблюдаются изменения интенсивности полос карбонильных, аминогрупп и двойных связей, причем оно достигает максимума при равном соотношении концентраций ионов Cu^{2+} и гуанозина, что свидетельствует об образовании комплекса 1:1. Для раствора гуанозина в ДМСО существование комплекса было доказано с по-

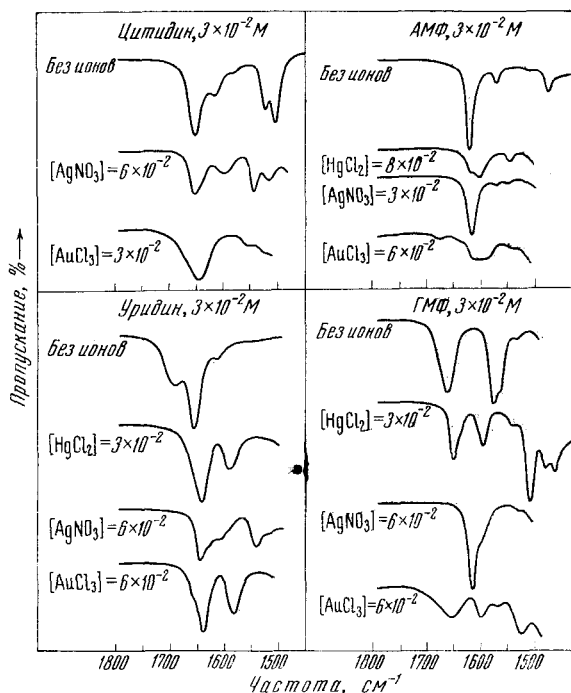


Рис. 16. ИК-спектры D_2O растворов цитидина, уридина, ГМФ, АМФ ($3 \cdot 10^{-2}\text{ M}$) в отсутствие и в присутствии ионов металлов¹⁹⁸

мощью дифференциального спектра, в котором наблюдались аналогичные изменения. Авторы предполагают, что образование комплекса $\text{Г} \cdot \text{Cu}^{2+}$ связано со сдвигом таутомерного равновесия гуанина в сторону его снольной формы и что этот сдвиг может быть причиной снижения температуры плавления ДНК. Уранил-ион образует с ДНК нерастворимый комплекс, стехиометрия которого зависит от pH среды и концентрации иона. Уранил-ион соединяется с фосфатными группами ДНК, поскольку в спектре этого комплекса наблюдается смещение полос поглощения фосфатных групп¹⁰⁷. Таким образом, ИК-спектроскопия может оказаться полезной при выяснении места локализации ионов металлов в их комплексах с нуклеиновыми кислотами.

Взаимодействие ДНК с различными соединениями, представляющими интерес с точки зрения биохимии или защиты молекул ДНК от различных воздействий, также можно изучать методом ИКС. Одним из таких соединений является мио-инозит, предотвращающий гибель бакте-

риальных клеток при дегидратации и защищающий их при облучении УФ-лучами. Значительное повышение чувствительности микроорганизмов к облучению и дегидратации происходит в интервале относительной влажности от 75 до 50%, т. е. там, где происходит дезорганизация упаковки оснований спирали ДНК^{209–213}. Предварительные физико-химические исследования привели к предположению, что соединения, подобные инозиту, играют роль связанной воды при частичной дегидратации или облучении клеток и их компонентов^{214, 215}. Исследование изменения поляризации ИК-спектра ДНК дало прямое доказательство этого предположения²⁰⁶. Как указано выше, понижение отн. вл. пленок ДНК от 75 до 30% сопровождается значительным уменьшением отношения дихроизма для полосы 1670 см^{-1} . Присутствие инозита поддерживает значение R_{1670} постоянным при дегидратации пленки ДНК в интервале отн. вл. 84–10%. Эти результаты могут означать, что мио-инозит замещает молекулы воды в структуре ДНК при ее дегидратации и, таким образом, стабилизирует спиральную конфигурацию ДНК²¹⁶. В настоящее время, к сожалению, эта работа является единственной. Тем не менее, ИК-спектроскопия может оказаться весьма перспективной при изучении взаимодействия нуклеиновых кислот с радиозащитными агентами, мутагенами, канцерогенами и другими биологически активными веществами.

Измерение интенсивности полос ИК-спектров ДНК и ее компонентов является очень важным при исследованиях повреждений ДНК и различных взаимодействий, что убедительно показано в работах по изучению специфического взаимодействия оснований ДНК в растворе, обсуждаемых в настоящей главе.

Кроме того, Майлз²¹⁷, используя в качестве меры интенсивности площадь полос поглощения (по Рамзау)²¹⁸, показал, что интегральная интенсивность полос в области $1700\text{—}1600\text{ см}^{-1}$ для D_2O растворов некоторых нуклеотидов и полинуклеотидов пропорциональна их концентрации. Таким образом, Майлзу удалось доказать количественно, что при смешивании растворов поли-А и поли-У наблюдается заметное отклонение от аддитивности интенсивности полос в указанном интервале в результате образования водородных связей, в то время как для смеси мононуклеотидов аддитивность соблюдается.

Измерения интенсивности полос поглощения для растворов ДНК и нуклеотидов позволит, по-видимому, следить за изменением в структуре оснований при сдвигах таутомерного равновесия или при различных воздействиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сб. Нуклеиновые кислоты, под ред. Э. Чаргаффа и Дж. Дэвидсона, ИЛ, М., 1962.
2. С. Е. Бреслер, Введение в молекулярную биологию, М.—Л., изд. АН СССР, 1963.
3. Р. Холли, Д. Ангар, Г. Эверетт, Д. Медисон, М. Марин, С. Мэрилл, Д. Пенсвик, А. Замир, в сб. Синтез и структура нуклеиновых кислот, «Мир», М., 1966.
4. F. H. Crick, J. D. Watson, Proc. Roy. Soc., **A223**, 80 (1954).
5. J. D. Watson, F. H. Crick, Nature, **171**, 737, 964 (1953).
6. A. Rich, R. D. Davies, J. Am. Chem. Soc., **78**, 3548 (1956).
7. A. Rich, Brookhav. Sympos., **12**, 17 (1959).
8. Дж. Уотсон, в сб. Химические основы наследственности, ИЛ, М., 1960, стр. 446.
9. A. Pur, Там же, стр. 446.
10. T. Shimanouchi, M. Tsuboi, Y. Kyogoku, Adv. in Chem. Phys., **7**, 435 (1965).
11. M. Tsuboi, Adv. in Appl. Spectrosc., **3**, 46—90 (1969).
12. E. R. Blout, M. Fields, Science, **107**, 252 (1948).

13. E. R. Blout, M. Fields, J. Biol. Chem., **178**, 335 (1949).
14. E. R. Blout, H. Lenormant, Biochim. biophys. acta, **15**, 303 (1954).
15. E. R. Blout, H. Lenormant, Там же, **17**, 325 (1955).
16. M. J. Fraser, R. D. Fraser, Nature, **167**, 761 (1951).
17. G. B. B. M. Sutherland, M. Tsuboi, Proc. Roy. Soc., **A239**, 446 (1957).
18. E. M. Bradbury, W. C. Price, G. R. Wilkinson, J. Mol. Biol., **3**, 301 (1961).
19. M. Falk, R. Hartman, R. C. Lord, J. Am. Chem. Soc., **85**, 387, 391 (1963).
20. H. Fritzsche, Biochim. biophys. acta, **119**, 645 (1966).
21. H. Fritzsche, Studia Biophys., **1**, 273 (1966).
22. H. Fritzsche, Biopolym., **5**, 863 (1967).
23. M. Tsuboi, K. Shuto, S. Higuchi, Bull. Chem. Soc. Japan, **41**, 1821 (1968).
24. К. Наканиси, Инфракрасные спектры и строение органических соединений, «Мир», М., 1965.
25. Л. Беллами, Инфракрасные спектры сложных молекул, ИЛ, М., 1963.
26. Применение спектроскопии в химии, под ред. В. Веста, ИЛ, М., 1959.
27. T. Sato, Y. Kyogoku, S. Higuchi, Y. Mitsui, Y. Iitaka, M. Tsuboi, K. Miura, J. Mol. Biol., **16**, 180 (1966).
28. M. Tsuboi, Biopolym., Symposia, **1**, 527 (1964).
29. C. L. Angell, J. Chem. Soc., **1961**, 504.
30. Б. И. Сухоруков, Биофизика, **7**, 664 (1962).
31. M. Tsuboi, Y. Kyogoku, T. Shimanouchi, Biochim. biophys. acta, **55**, 1 (1962).
32. Б. И. Сухоруков, Кандид. диссерт., ИХФ АН СССР, М., 1964.
33. Б. И. Сухоруков, В. Ц. Айказян, Ю. А. Ершов, Биофизика, **11**, 753 (1966).
34. Г. В. Казакова, Ж. структ. химии, **10**, 618 (1969).
35. R. Sinsheimer, R. Nutter, G. R. Hopkins, Biochim. biophys. acta, **18**, 13 (1955).
36. А. Эллиот, в сб. Успехи спектроскопии, ИЛ, М., 1963, стр. 269.
37. Р. Збинден, Инфракрасная спектроскопия высокополимеров, «Мир», М., 1966.
38. T. Shimanouchi, M. Tsuboi, Y. Kyogoku, I. Watanabe, Biochim. biophys. acta, **45**, 195 (1960).
39. Y. Kyogoku, M. Tsuboi, T. Shimanouchi, I. Watanabe, Nature, **189**, 120 (1961).
40. M. Tsuboi, K. Matsuo, T. Shimanouchi, Y. Kyogoku, Spectrochim. acta, **19**, 1617 (1963).
41. M. Tsuboi, K. Shuto, S. Takemura, S. Nishimura, Bull. Chem. Soc. Japan, **42**, 102 (1969).
42. R. Cotter, W. Gratzer, Nature, **221**, 154 (1969).
43. R. Cotter, W. Gratzer, Europ. J. Biochem., **8**, 352 (1969).
44. G. Felsenfeld, H. T. Miles, в кн. Ann. Rev. Biochem., **36**, 407 (1967).
45. D. R. Davies, Nature, **186**, 1030 (1960).
46. H. T. Miles, Там же, **183**, 1814 (1959).
47. H. T. Miles, Biochim. biophys. acta, **35**, 247 (1959).
48. H. T. Miles, J. Frazier, Там же, **79**, 216 (1964).
49. H. T. Miles, Там же, **45**, 196 (1960).
50. H. T. Miles, J. Frasier, Bioch. Biophys. Res. Commun., **14**, 21 (1964).
51. H. T. Miles, в кн. Methods in Enzymology, Nucleic acids, 1968, v. 12B, 256.
52. F. Howard, J. Frazier, H. T. Miles, J. Biol. Chem., **224**, 1291 (1969).
53. R. C. Lord, G. J. Thomas, в кн. Develop. in Appl. Spectrosc., **6**, 179 (1968).
54. M. C. Tobin, Spectrochim. acta, **A25**, 1855 (1969).
55. G. Thomas, Biochim. biophys. acta, **213**, 417 (1970).
56. Э. Ф. Олейник, В. З. Компаниец, в сб. Новое в методах исследования полимеров, «Мир», М., 1969, стр. 243.
57. M. H. F. Wilkins, R. G. Gosling, W. E. Seeds, Nature, **167**, 759 (1951).
58. R. E. Franklin, R. G. Gosling, Acta Cryst., **6**, 673 (1953).
59. M. H. F. Wilkins, W. E. Seeds, A. R. Stokes, H. R. Wilson, Nature, **172**, 759 (1953).
60. Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын, Конформации макромолекул, «Наука», М., 1964.
61. С. Багавантам, Т. Венкатарайду, Теория групп и ее применение к физическим проблемам, ИЛ, М., 1959.
62. Е. Вильсон, Дж. Дешиус, П. Кросс, Теория колебательных спектров молекул, ИЛ, М., 1960.
63. Ю. Д. Канаскова, Кандид. диссерт., МГУ, 1970.
64. D. J. Brown, L. N. Short, J. Chem. Soc., **1953**, 331.
65. L. N. Short, H. W. Thompson, Там же, **1952**, 168.
66. E. Tanner, Spectrochim. acta, **8**, 9 (1956).
67. J. A. Brownlie, G. B. Sutherland, A. Todd, J. Chem. Soc., **1948**, 2265.
68. J. A. Brownlie, Там же, **1950**, 3062.

69. H. Thompson, D. Nicholson, L. Short, *Disc. Faraday Soc.*, **9**, 222 (1950).
70. C. L. Angell, R. L. Werner, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 2911.
71. L. Pauling, R. B. Corey, *Arch. biochem. biophys.*, **65**, 164 (1956).
72. C. Willits, I. Decius, K. Dille, B. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2569 (1955).
73. Ю. М. Боярчук, М. В. Волькенштейн, *Биофизика*, **12**, 717 (1967).
74. J. M. Broomhead, *Acta Cryst.*, **1**, 324 (1948).
75. J. M. Broomhead, *Там же*, **4**, 81 (1951).
76. S. Furberg, *Acta Chemika Scand.*, **4**, 751 (1950).
77. S. Furberg, *Acta Cryst.*, **3**, 325 (1950).
78. D. G. Watson, R. M. Sweet, R. E. Marsh, *Там же*, **19**, 573 (1965).
79. D. G. Watson, D. J. Sutor, P. Tollin, *Там же*, **19**, 111 (1965).
80. Ch. E. Bugg, U. T. Thewalt, R. E. Marsh, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **33**, 436 (1968).
81. K. Ozeki, N. Sakaba, J. Tanaka, *Acta cryst.*, **B25**, 1038 (1969).
82. M. Stimpson, M. J. D'Onnell, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1805 (1952).
83. E. R. Blout, M. Fields, *Там же*, **72**, 479 (1950).
84. E. R. Blout, H. Lenormant, *Там же*, **73**, 1093 (1953).
85. H. Lenormant, C. de Lozé, *Bull. soc. chim. France*, **1955**, 1501.
86. H. Lenormant, E. R. Blout, *C. r.*, **239**, 1281 (1954).
87. M. Stimpson, M. J. O'Donnell, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1805 (1952).
88. R. Foglizzo, A. Novak, *J. Chim. Phys.*, **64**, 1484 (1967).
89. A. Lautie, A. Novak, *Там же*, **65**, 1359 (1968).
90. R. Harris, S. Orr, E. Roe, J. Thomas, *J. Chem. Soc.*, **1953**, 489.
91. A. M. Michelson, A. R. Todd, *Там же*, **1954**, 34.
92. C. A. Dekker, D. T. Elmore, *Там же*, **1951**, 2864.
93. R. Souda, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 499 (1957).
94. R. C. Lord, A. L. Marston, F. A. Miller, *Spectrochim. acta*, **9**, 113 (1957).
95. S. Läufer, *Ztschr. anal. Chem.*, **181**, 487 (1961).
96. В. И. Малеев, А. Е. Станевич, *Опт. и спектроск.*, **25**, 72 (1968).
97. H. T. Miles, *Biochim. biophys. acta*, **22**, 247 (1956).
98. H. T. Miles, *Там же*, **27**, 46 (1958).
99. H. T. Miles, *Там же*, **30**, 324 (1958).
100. H. T. Miles, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **47**, 791 (1961).
101. H. T. Miles, F. B. Howard, J. Frazier, *Science*, **142**, 1458 (1963).
102. G. J. Thomas, *Biopolym.*, **7**, 325 (1969).
103. R. C. Lord, G. J. Thomas, *Spectrochim. acta*, **23A**, 2551 (1967).
104. С. А. Силаева, Л. А. Казницына, М. А. Прокофьев, *Вестн. МГУ, химия*, **1964**, № 4, 75.
105. H. Fritzsche, *Biochim. biophys. acta*, **149**, 173 (1967).
106. M. P. Printz, P. H. von Hippel, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **53**, 363 (1965).
107. Л. А. Остерманн, В. В. Адлер, Р. Бебелашвили, Л. П. Савоськина, Я. М. Варшавский, *Биохимия*, **31**, 398 (1966).
108. R. Gompper, H. Herlinger, *Chem. Ber.*, **89**, 2825 (1956).
109. M. Horak, I. Gut, *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **26**, 1680 (1961).
110. E. M. Layton, R. D. Kross, V. A. Fassel, *J. Chem. Phys.*, **25**, 135 (1956).
111. D. Coos, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 49 (1957).
112. A. Albert, E. Spinner, *J. Chem. Soc.*, **1960**, 1221.
113. E. Spinner, *J. Chem. Soc.*, **1960**, 1226, 1232.
114. H. Thompson, D. Nicholson, L. Short, *Trans. Faraday Soc.*, **9—12**, 232 (1952).
115. F. A. Cotton, A. Wilkinson, *Adv. in Organic Chemistry*, N. Y., AP, 1959, стр. 84, 219.
116. D. A. Netzel, T. S. Hermann, F. F. Bentley, *Appl. Spectr.*, **22**, 170 (1968).
117. Ю. Д. Канаскова, Б. И. Сухоруков, Ю. А. Пентин, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1970**, 1735.
118. Ю. Д. Канаскова, Б. И. Сухоруков, Ю. А. Пентин, *Там же*, **1970**, № 12.
119. Б. И. Сухоруков, Г. И. Матханов, *Биофизика*, **8**, 131 (1963).
120. Б. И. Сухоруков, В. И. Полтев, Л. А. Блюменфельд, *ДАН*, **149**, 1380 (1963).
121. W. Cochran, *Acta cryst.*, **4**, 92 (1951).
122. C. D. Jardetzky, O. Jardetzky, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 222 (1960).
123. A. Pullman, B. Pullman, *J. Chim. Phys.*, **58**, 904 (1961).
124. M. Tsuboi, *Spectrochim. acta*, **16**, 505 (1960).
125. H. T. Miles, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1007 (1963).
126. V. Luzzati, A. Nikolaietti, F. Masson, *J. Mol. Biol.*, **3**, 185 (1961).
127. В. Лудзати, в сб. *Нуклеиновые кислоты*, «Мир», М., 1965, стр. 389.
128. Дж. Мармур, Р. Раунд, К. Шильдкраут, *Там же*, стр. 258.
129. А. С. Спирин, *Там же*, стр. 341.

130. G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2023 (1957).
131. В. Я. Малеев, М. А. Семенов, Докл. АН УССР, **1970**, сер. Б, № 1, 73.
132. R. Langridge, W. E. Seeds, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. F. Wilkins, L. D. Hamilton, *J. Biophys. biochem. Cytol.*, **3**, 767 (1957).
133. D. A. Marvin, M. Spencer, M. H. F. Wilkins, L. D. Hamilton, *Nature*, **182**, 387 (1958).
134. Ше Мидон, Ю. Н. Чиргадзе, Т. Тихоненко, Вопросы вирусол., **5**, 619 (1970).
135. S. J. Webb, R. Buther, *Phys. Med. Biol.*, **15**, 271 (1970).
136. M. Falk, A. G. Poole, C. G. Goymour, *Canad. J. Chem.*, **48**, 1536 (1970).
137. М. Спенсер, в сб. Синтез и структура нуклеиновых кислот, «Мир», М., 1966, стр. 156.
138. M. Tsuboi, S. Higuchi, Y. Kyogoku, S. Nishimura, *Biochim. biophys. acta*, **195**, 23 (1969).
139. K. Morikawa, M. Tsuboi, Y. Kuogoku, T. S. Seno, S. Nighimura, *Nature*, **223**, 537 (1969).
140. В. Я. Малеев, М. А. Семенов, Л. М. Блок, Докл. АН УССР, **1970**, сер. Б, 448.
141. S. K. Dube, K. A. Marker, B. F. Clark, S. Cory, *Nature*, **218**, 232 (1968).
142. S. Higuchi, M. Tsuboi, Y. Iitaka, *Biopolym.*, **7**, 909 (1969).
143. E. M. Brudbery, W. C. Price, G. R. Wilkinson, G. Zubay, *J. Mol. Biol.*, **4**, 50 (1962).
144. E. M. Brudbery, W. C. Price, G. R. Wilkinson, Там же, **4**, 39 (1962).
145. K. Matsuo, Y. Mitsui, Y. Iitaka, M. Tsuboi, Там же, **38**, 129 (1968).
146. P. O. P. Ts'o, I. S. Melvin, A. C. Olson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1289 (1963).
147. P. O. P. Ts'o, S. J. Chan, Там же, **86**, 4176 (1964).
148. E. Kuchler, H. Tuppy, *Biochim. biophys. acta*, **80**, 669 (1964).
149. H. Tuppy, E. Kuchler, *Monatsch. Chem.*, **1964**, 1677.
150. S. J. Chan, M. P. Schweitzer, P. O. P. Ts'o, Helmkamp, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4182 (1964).
151. M. P. Schweitzer, P. O. P. Ts'o, Там же, **87**, 5241 (1965).
152. R. C. Lord, G. J. Thomas, *Biochim. biophys. acta*, **142**, 1 (1967).
153. Y. Kyogoku, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, I. Watanabe, *Nature*, **195**, 460 (1962).
154. H. T. Miles, Там же, **195**, 459 (1962).
155. K. Hoogsten, *Acta cryst.*, **16**, 907 (1963).
156. F. Mathews, A. Rich, *J. Mol. Biol.*, **8**, 89 (1964).
157. H. M. Sobell, K. Tomita, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **49**, 885 (1963).
158. A. Haschemeyer, H. M. Sobell, *Nature*, **202**, 969 (1964).
159. L. Katz, K. Tomita, A. Rich, *J. Mol. Biol.*, **13**, 340 (1965).
160. L. Katz, Там же, **44**, 279 (1969).
161. R. Hamlin, R. C. Lord, A. Rich, *Science*, **148**, 1734 (1965).
162. Y. Kyogoku, R. C. Lord, A. Rich, Там же, **154**, 518 (1966).
163. E. Kuchler, J. Derkosch, *Naturforsch.*, **B21**, 209 (1966).
164. J. Pitha, R. N. Jones, P. Pithova, *Canad. J. Chem.*, **44**, 1045 (1966).
165. Y. Kyogoku, R. C. Lord, A. Rich, *Biochim. biophys. acta*, **179**, 10 (1969).
166. D. Brown, M. Hewlins, *Nature*, **221**, 656 (1969).
167. J. H. Miller, H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.*, **24**, 345 (1967).
168. L. Katz, S. Penman, Там же, **44**, 279 (1969).
169. R. Shoup, H. T. Miles, E. Becker, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 194 (1966).
170. Y. Kyogoku, R. C. Lord, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 496 (1967).
171. U. Krüger, H. Breuer, F. Abdel-Kerim, H. Rerkampus, K. Schweiz, *Naturforsch.*, **23B**, 1360 (1968).
172. М. К. Дроздова, А. Я. Козоровицкий, Ю. К. Наберухин, Мол. биол., **3**, 201 (1969).
173. J. S. Binford, D. M. Hollway, *J. Mol. Biol.*, **31**, 91 (1968).
174. G. C. Pimentel, A. L. McClellan, *The Hydrogen Bond*, N. Y., 1960.
175. Y. Kyogoku, R. C. Lord, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **57**, 250 (1967).
176. J. H. Coates, D. O. Jordan, V. K. Srivastava, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 611 (1964).
177. D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1003 (1958).
178. F. Howard, J. Frasier, H. T. Miles, *J. Biol. Chem.*, **224**, 1291 (1969).
179. R. C. Warner, Там же, **229**, 711 (1957).
180. G. Felsenfeld, A. Rich, *Biochim. biophys. acta*, **26**, 475 (1957).
181. R. Beers, R. Steiner, *Nature*, **181**, 30 (1958).
182. M. Gellert, M. N. Lippsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**, 2013 (1962).
183. C. A. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6052 (1954).

184. Y. Kawada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 204 (1963).
185. G. L. Eichgorn, P. Clark, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 4020 (1963).
186. G. L. Eichgorn, P. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **53**, 586 (1965).
187. R. B. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2059 (1964).
188. M. N. Lipsett, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1250 (1964).
189. H. T. Writh, N. Davidson, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4325 (1964).
190. R. Jensen, N. Davidson, *Biopolym.*, **4**, 17 (1966).
191. M. Daune, C. A. Dekker, H. K. Schachman, Там же, **4**, 51 (1966).
192. K. A. Hartman, *Biochim. biophys. acta*, **138**, 192 (1967).
193. G. L. Eichgorn, *Nature*, **194**, 474 (1962).
194. J. A. V. Butler, B. E. Conway, D. W. Janus, *Trans. Faraday Soc.*, **50**, 612 (1954).
195. K. C. Banerjee, D. I. Perkins, *Biochim. biophys. acta*, **61**, 1 (1962).
196. J. Shack, R. J. Jenkins, J. M. Thompsett, *J. Biol. Chem.*, **198**, 85 (1952).
197. I. Eisinger, R. Shulman, B. Shymanski, *J. Chem. Phys.*, **36**, 172 (1962).
198. H. Sternlicht, R. Shulman, E. Anderson, Там же, **43**, 3123 (1965).
199. R. G. Shulman, H. Sternlicht, B. Wylida, *J. Chem. Phys.*, **43**, 3116 (1965).
200. G. L. Eichgorn, P. Clark, E. Becker, *Biochem.*, **5**, 245 (1966).
201. Ch. Zimmer, H. Venner, *Studia Biophys.*, **2**, 207 (1967).
202. K. A. Hartman, *Biochim. biophys. acta*, **138**, 192 (1967).
203. К. Б. Яцимирский, Е. Е. Крисс, Т. И. Ахрамеева, А. С. Сегеда, Реф. докладов на IX Мендел. съезде по общ. и прикладн. химии. Секция химии и техн. природных соедин. «Наука», М., 1965.
204. Е. Е. Крисс, К. Б. Яцимирский, *Усп. химии*, **35**, 349 (1966).
205. C. R. Zobel, M. Beer, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 335 (1961).
206. T. Yamane, N. Davidson, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2599 (1961).
207. H. Fritzsche, C. Zimmer, *Eur. J. Biochem.*, **5**, 42 (1968).
208. Л. Н. Дроздов-Тихомиров, Л. И. Кикоин, *Биофизика*, **12**, 407 (1967).
209. R. W. Kaplan, C. Kaplan, *Exp. Cell Res.*, **11**, 378 (1956).
210. S. Webb, *Canad. J. Microbiol.*, **5**, 649 (1959).
211. S. Webb, Там же, **13**, 733 (1967).
212. G. E. Heff, *J. Appl. Microbiol.*, **13**, 781 (1965).
213. C. Cox, F. Baldwin, *J. Gen. Microbiol.*, **49**, 115 (1967).
214. S. Webb, *Canad. J. Microbiol.*, **6**, 71 (1960).
215. S. Webb, *J. Appl. Bacteriol.*, **26**, 307 (1963).
216. S. Webb, I. Bhorjee, *Canad. J. Biochem.*, **46**, 691 (1968).
217. H. T. Miles, *Biochim. Biophys. acta*, **30**, 324 (1958).
218. D. A. Ramsay, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 72 (1952).

Институт химической физики
АН СССР, Москва