

М. К. СОЛНЦЕВ, А. Х. КЕРКИН, А. К. КУКУШКИН

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОВЫСВЕЧИВАНИЯ РАСТВОРОВ НЕКОТОРЫХ НУКЛЕОТИДОВ И АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Исследовано термовысвечивание нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований нуклеиновых кислот.

В серии работ, опубликованных ранее [1—5], нами было исследовано термовысвечивание (ТВ) порошкообразных образцов нуклеиновых кислот (НК) и их пуриновых и пиримидиновых оснований для выяснения механизмов запасаения и миграции энергии ультрафиолетового (УФ) излучения в этих биологически важных молекулах.

Настоящая работа является продолжением работ этого цикла и посвящена исследованию ТВ растворов некоторых нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований НК. Растворы этих веществ удобны для такого рода исследований, так как в них легко могут быть введены различные примеси (например, ионы металлов), влияющие на процессы запасаения и миграции энергии в изучаемых препаратах. Для некоторых вводимых добавок, кроме того, известны места и характер их связывания с основным веществом раствора [6].

Методика

Принципиальная схема установки и методика проведения экспериментов по исследованию ТВ изложены в работах [1, 7]. Поэтому остановимся лишь на тех изменениях в методике, которые были вызваны изучением образцов в виде растворов.

Охлаждение растворов производили следующим образом. В покрытое золотом углубление горизонтально расположенного держателя заливали 0,15 мл исследуемого раствора и накрывали его кварцевым стеклом. Затем в течение 4-х мин лили жидкий азот на стекло, в результате чего раствор охлаждался примерно до 210° К. После этого помещали держатель в криостат и откачивали из последнего воздух. В полость держателя, сообщающуюся с атмосферой, подливали по мере надобности небольшие количества жидкого азота для поддержания неизменной температуры раствора около 210° К. С момента откачивания воздуха из криостата ловушка заполнялась жидким азотом.

По достижении в криостате давления порядка $3 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. заполняли до краев полость держателя образца жидким азотом, благодаря чему температура раствора понижалась до 77°K . Примерно через 5 мин после достижения минимальной температуры давление в криостате опускалось до $6 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст.

Охлажденный и вакуумированный таким образом образец облучали либо полным спектром ртутной лампы ПРК-2 (или ДРШ-250) с интенсивностью падающего на образец света, близкой к $50 \text{ эрг} \cdot \text{мм}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$, либо областью спектра этих источников, вырезаемой интерференционными фильтрами.

После облучения образец обычно выдерживали при 77°K до того времени, когда интенсивность послесвечения уменьшалась на 95%. Затем раствор нагревали с постоянной скоростью, близкой к $20 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$, и регистрировали появляющееся при этом излучение ТВ. В качестве приемника излучения использовали ФЭУ-38 с областью максимальной чувствительности 400—440 нм.

В работе использовались следующие препараты без дополнительной очистки: динатриевая соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (АТФ) с м. в. 551,23; тринатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) с м. в. 493,21; аденозин с м. в. 267,25; цитидин с м. в. 243,23; аденин с м. в. 135,14; тимин с м. в. 126,12 и урацил с м. в. 112,09 фирмы Reanal; аденозин-5-монофосфорная кислота (АМФ) с м. в. 365,25 чехословацкого производства и 6-метилтиоурацил производства Харьковско-го химического завода.

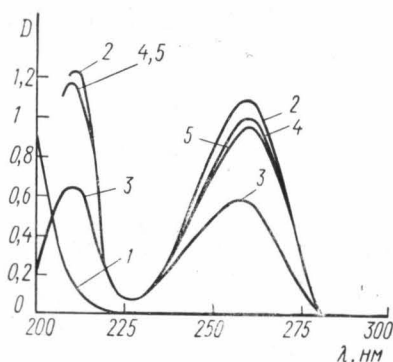


Рис. 1. Характерные спектры поглощения растворов, снятые на спектрофотометре Unicam SP-800. 1 — трис-НСI-буфер, 2 — АТФ ($8 \cdot 10^{-5}$ М) — свежеприготовленный раствор, 3 — АТФ ($8 \cdot 10^{-5}$ М) после нескольких дней хранения в холодильнике, 4 — АТФ с ионами Mg^{2+} ($1 \cdot 10^{-4}$ М) в инкубационной смеси, 5 — АТФ с ионами Ni^{2+} ($1 \cdot 10^{-4}$ М) в инкубационной смеси

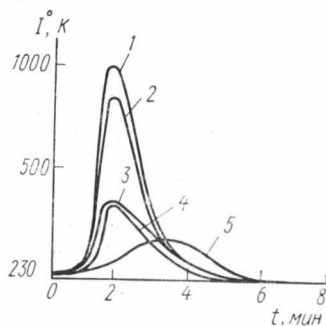


Рис. 2. Характерные кривые ТВ-растворов при концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ М. 1 — АТФ, 2 — аденин, 3 — АДФ, 4 — АМФ, 5 — аденозин

Растворителем служил трис-НСI-буфер (0,005 м. рН 8), не поглощающий в области основного поглощения исследованных веществ ($\lambda_m = 260 \text{ нм}$) и слабо поглощающий при других длинах волн вплоть до 215 нм , где оптическая плотность буфера равна 0,06 (рис. 1). Препарат гриса фирмы Merck, использованный для приготовления буфера, имел м. в. 121,23.

Все эксперименты (кроме исследований зависимости интенсивности ТВ от концентрации раствора АТФ и исследований спектрального состава послесвечения и ТВ) проведены с растворами при концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ М.

При исследовании влияния ионов металлов на ТВ в трис-НСI-буфере растворяли хлористые соли марганца, никеля, магния или кальция в концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ М. Затем для создания определенных соотношений ионов металлов и молекул АТФ смешивали нужные количества раствора основного вещества и раствора, содержащего определенные ионы металла.

Все эксперименты проводились с растворами, приготовленными в тот же день, так как при хранении растворов их оптическая плотность уменьшается (см. рис. 1).

Более подробно методика описана в работе [8].

Результаты

Нами было обнаружено ТВ растворов АТФ, АДФ, АМФ, аденозина, аденина. Характерные кривые ТВ этих препаратов в условных единицах представлены на рис. 2. Найдено различие в характеристиках полученных кривых ТВ растворов исследованных веществ при одинако-

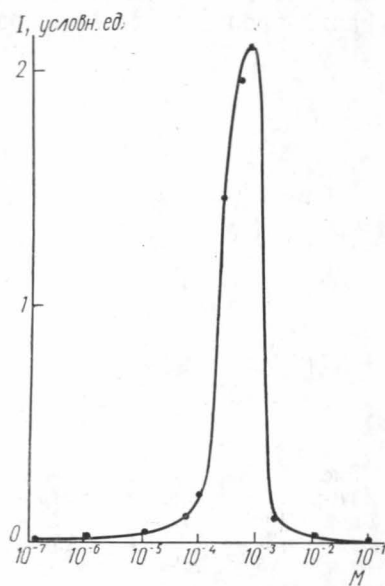


Рис. 3. Зависимость интегральной интенсивности ТВ-растворов АТФ от концентрации

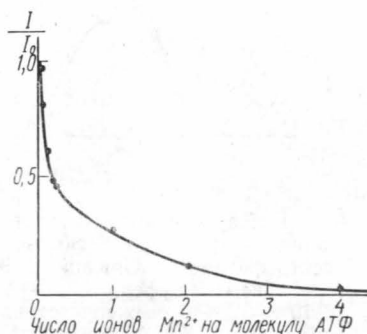


Рис. 4. Тушение ТВ-раствора АТФ ($8 \cdot 10^{-5}$ М) ионами Mn^{2+} . I_0 — интегральная интенсивность ТВ «чистого» раствора АТФ, I — интегральная интенсивность ТВ-раствора АТФ в присутствии ионов Mn^{2+}

вых концентрациях. Интенсивность ТВ оказалась максимальной у растворов АТФ. Температурный максимум кривой ТВ раствора аденозина $135^\circ K$, у остальных растворов он оказался близким к $110^\circ K$. При той же чувствительности установки не удалось зарегистрировать ТВ раство-

ров тимина, урацила, цитидина и 6-метилтиоурацила при концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ М. Если принять во внимание, что в замороженных растворах пиримидинов при рН, близких к нейтральным, фосфоресценция не наблюдалась [9], то отсутствие у них ТВ может служить, по-видимому, косвенным доказательством участия триплетного уровня в этом процессе.

На растворах АТФ исследовали зависимость интенсивности ТВ от концентрации растворенного вещества. Концентрацию изменяли от 10^{-7} до 10^{-1} М. На рис. 3 представлена кривая, характеризующая эту зависимость. Полученный результат можно объяснить, если предположить, что до концентраций, близких к 10^{-3} М, вероятность образования возбужденных состояний молекул увеличивается с ростом их концентрации в растворе. При дальнейшем повышении концентрации проявляется конкурирующее действие эффекта концентрационного тушения, приводящее к уменьшению интенсивности ТВ.

Установлена связь между интенсивностью ТВ и временем облучения раствора АТФ. Через пять минут после начала облучения интенсивность достигала «насыщения». Это свидетельствует о том, что такого промежутка времени достаточно для возбуждения максимально возможного количества молекул АТФ в растворе и что под действием УФ-света не образуются новые центры свечения ТВ.

Для выяснения природы центров свечения ТВ в растворах АТФ были проведены опыты по изучению влияния ионов металлов на интенсивность ТВ. Аналогичные опыты проводились нами ранее на порошкообразных образцах сульфата аденина [1], однако в этих опытах оставался открытым вопрос о распределении добавляемых примесей в объеме основного вещества. Известно, например из [6], что ионы Mn^{2+} и Ni^{2+} в растворах АТФ связываются с ароматической частью и с фосфатными группами молекул АТФ. Также известно, что при соотношении числа ионов и молекул АТФ 1 : 1 происходит полное связывание добавок с АТФ [6].

Мы обнаружили, что при добавлении парамагнитных ионов уменьшается интенсивность ТВ, причем это уменьшение тем сильнее, чем большее число ионов приходится на одну молекулу АТФ. При соотношении $Mn^{2+}:АТФ=4:1$ происходит почти полное тушение ТВ. В случае $Mn^{2+}:АТФ=1:30$ интенсивность ТВ уменьшается примерно на 40% (рис. 4). Ионы Ni^{2+} , взятые в таких же пропорциях, действовали более эффективно. Добавление диамагнитных ионов, напротив, приводило к увеличению интенсивности ТВ, причем из двух исследованных типов ионов, Ca^{2+} и Mg^{2+} , первые действовали сильнее. Эффективность действия диамагнитных ионов, как и в случае парамагнитных ионов, зависела от соотношения ионов металла и молекул АТФ в исследуемом растворе. Изменения положения температурного максимума при добавлении всех видов ионов металлов мы не наблюдали. Полученные результаты представлены в таблице, в которой приводится влияние ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} на интенсивность ТВ растворов АТФ (I_0 — интенсивность ТВ раствора АТФ без добавок; I — интенсивность ТВ раствора АТФ той же концентрации при добавлении ионов металлов).

Вид иона	Отношение числа ионов металла к числу молекул АТФ в растворе	I/I_0 (с точностью $\pm 0,1$)
Ca^{2+}	1	2,0
	10	8,0
Mg^{2+}	4	1,0
	10	3,0
Mn^{2+}	1	0,3
	0,05	0,6

Влияние парамагнитных ионов на интенсивность ТВ, вероятно, связано с тем, что они стимулируют безызлучательный переход энергии возбуждения в молекулах. Если предположить равномерное распределение молекул АТФ в растворе, то расстояния между ними окажутся близкими к 300 Å. В хаотически ориентированных системах в настоящее время неизвестны механизмы миграции энергии на такие расстояния [10]. В наших экспериментах при отношении числа парамагнитных ионов к молекулам АТФ меньшем единицы наблюдалось уменьшение интенсивности ТВ, которое нельзя объяснить тушением ТВ только за счет связывания молекул АТФ с ионами металлов. Для объяснения эффективного тушения ТВ можно предположить, что в растворе молекулы АТФ образуют ассоциаты, в результате чего увеличивается вероятность безызлучательных переходов за счет миграции в них запасенной энергии. Возможность образования такого рода ассоциатов уже отмечалась в литературе [11]. Диамагнитные ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} усиливали ТВ, образуя, по-видимому, новые центры свечения. Предполагая зависимость количества этих центров от величины радиуса диамагнитного иона, можно объяснить более эффективное действие ионов Ca^{2+} ($R \approx 1,00 \text{ \AA}$) по сравнению с ионами Mg^{2+} ($R \approx 0,78 \text{ \AA}$) [14].



Рис. 5. Влияние Δt на интенсивность ТВ-раствора АТФ. 1 — $\Delta t = 5 \text{ мин}$ (через 2,5 мин после окончания облучения), 2 — $\Delta t = 40 \text{ мин}$ (через 37,5 мин после окончания облучения)

Нами была обнаружена корреляция между интенсивностью ТВ и начальной интенсивностью послесвечения в растворах АТФ. При одинаковых дозах облучения, около $30 \text{ эрг} \cdot \text{мм}^{-2}$, послесвечение растворов с концентрацией $8 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ продолжалось примерно 50 мин, а при концентрации АТФ $1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ длительность послесвечения превышала 65 мин. Соответственно и интенсивность ТВ во втором случае была выше. Изучено влияние промежутка времени между окончанием облучения и началом нагревания образца (Δt) на интенсивность ТВ. Установлено, что в случае $\Delta t = 5 \text{ мин}$ интенсивность послесвечения примерно в 12 раз выше, чем в случае $\Delta t = 40 \text{ мин}$. Интенсивности ТВ в обоих случаях оказались близкими,

хотя светосумма, отданная образцом в процессе послесвечения во втором опыте на 35 мин (с 5-й по 40-ю минуту после облучения), в несколько раз превосходила светосумму, соответствующую ТВ. После окончания процесса ТВ (примерно через 10 мин после начала нагревания) для разных Δt послесвечение не наблюдалось (рис. 5).

С помощью интерференционных фильтров мы показали, что спектр действия ТВ растворов АТФ с концентрацией $8 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ практически совпадает со спектром поглощения этих растворов при комнатной температуре.

Были получены спектры послесвечения и ТВ растворов АТФ и АМФ с концентрацией $8 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Для этого использовали клиновый интерференционный непрерывный фильтр. Установлено, что спектры послесвечения и ТВ совпадают; спектральный состав послесвечения и ТВ не изменяется со временем.

Для выяснения того, является ли процесс ТВ одно- или двухквантовым по триплетным уровням, мы провели сравнение ТВ растворов

АТФ после непрерывного облучения и облучения прерывистым светом с равными интервалами свет — темнота и темнота — свет, равными 1,3 или 5,2 сек. Установлена зависимость отношения интенсивностей ТВ в результате прерывистого и непрерывного освещения от времени жизни триплетного состояния и продолжительности облучения. Построенная кривая этой зависимости не совпадает с известной из литературы [12], описывающей двухквантовый процесс. Это позволяет думать, что процесс ТВ является одноквантовым по триплетным уровням.

На основании полученных результатов по исследованию ТВ замороженных растворов можно предположить следующий качественный механизм этого процесса. При действии УФ-света на растворы АТФ, АДФ, АМФ, аденозина и пуриновых оснований НК происходит образование катион-радикала ароматической части молекул и гидратированного электрона. Хотя энергия УФ-излучения в максимуме области основного поглощения исследованных веществ несколько меньше потенциала ионизации ароматических молекул (5 эв) [10], однако процесс ионизации может происходить в результате влияния сильно полярной среды. Возможность такого рода процессов экспериментально обнаружена и описана в работе [13]. При нагревании электрон освобождается из ловушки и рекомбинирует с катион-радикалом в возбужденном состоянии, скорее всего в триплетном. Излучательная дезактивация возбужденного состояния дает регистрируемое излучение ТВ. Миграция энергии имеет место скорее всего в возбужденном состоянии.

Пользуясь принятой возможностью, авторы благодарят Р. А. Толмачеву и Е. И. Волкову за большую помощь при отработке экспериментальной методики, доктора Ф. Пликетта (ГДР) за любезно предоставленные интерференционные фильтры и интересные обсуждения постановки некоторых опытов, а также сотрудников отдела физико-химических методов измерений межфакультетской лаборатории биорганической химии при МГУ за участие в проведении некоторых спектрофотометрических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Солнцев М. К., Кукушкин А. К. «Биофизика», 12, 769, 1967.
2. Солнцев М. К., Кукушкин А. К. В сб.: «Рефераты докладов научной конференции молодых ученых МГУ». Изд-во МГУ, 1968, стр. 55.
3. Кукушкин А. К., Солнцев М. К. Тезисы докладов на Ломоносовских чтениях. Изд-во МГУ, 1969, стр. 25.
4. Солнцев М. К. Химия пиримидина и конденсированных систем, включающих кольцо пиримидина. Доклад на Всесоюзном colloквиуме. Новосибирск, 1969, стр. 55.
5. Солнцев М. К. Актуальные вопросы молекулярной биологии. Материалы московской городской конференции молодых ученых, 1970, стр. 100.
6. Phillips R. «Chem. Rev.», 66, 502, 1966.
7. Кукушкин А. К., Кузнецов А. Н. «Биофизика», 11, 223, 1966.
8. Керкини А. Х. Дипломная работа. МГУ, 1970.
9. Гольдштейн И. И., Рошупкин Д. М. «Биохимия», 31, 927, 1966.
10. Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. Л., «Наука», 1967.
11. Nakano N. J., Jgagashi S. J. «Biochemistry», 9, 577, 1970.
12. Багдасарьян И. С. и др. ДАН СССР, 153, 374, 1963.
13. Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков. М., «Наука», 1965.
14. Гороновский И. Т., Назаренко Ю. П., Некряч Е. Ф. Краткий справочник по химии. Киев, 1962.