

Քիմիա

УДК 541.18

Մ. Գ. ԱԶՆԱՌԻՅԱՆ, Ա. Գ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Շ. Ա. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

**ԴԻԱԼԿԻԼՍՈՒԼՖՕՔՍԻԴՆԵՐԻ ՆԵՐԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ ԴՆԹ-Ի
ՉԵՐՄԱՅԻՆ ԴԵՆԱՏՈՒՐԱՑԻԱՅԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՖԼՈՒՈՐԵՍԿԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐՈՍԿՈՊԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴՈՎ**

Ներածություն: ԴՆԹ-ի պարույր-կծիկ անցումների վրա տարբեր տիպի դենատուրացնող նյութերի ազդեցությունը վերջին ժամանակներս մեծ հետաքրքրություն է առաջացրել [1, 2]: Այնպիսի գործոններ, ինչպիսիք են ջերմաստիճանը, ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան, pH-ը, լուծույթում աղերի առկայությունը և խառը լուծիչները (ջուր-օրգանական լուծիչ), էականորեն ազդում են ԴՆԹ-ի պարույր-կծիկ անցումների վրա [3]:

ԴՆԹ-ն ջրային լուծույթներում ունի շատ թույլ ֆլուորեսցենցիա, ուստի այդ մեթոդով ուսումնասիրելիս անհրաժեշտ է վերջինս փոխազդեցության մեջ դնել (կապել) այնպիսի մոլեկուլների (նշանակրերի) հետ, որոնք ցուցաբերում են ֆլուորեսցենտային հատկություններ: Այնուհետև, հետևելով այդ նշանակրի ֆլուորեսցենտային ազդանշանին, կարելի է տեղեկություն ստանալ ԴՆԹ-ի կառուցվածքային փոփոխությունների, դենատուրացիայի վերաբերյալ [4]:

Այս աշխատանքում որպես նշանակիր օգտագործվել է էթիդիումի բրոմիդը (ԷԲ): Հետևելով վերջինիս ֆլուորեսցենտային ազդանշանին՝ հնարավոր է դարձել ուսումնասիրել ԴՆԹ-ի ջերմային դենատուրացիան դիալկիլսուլֆօքսիդների (ԴԱՍՕ) ներկայությամբ:

Օգտագործված նյութերը և հետազոտման եղանակը: Ուսումնասիրություններում օգտագործվել են հորթի թիմուսի ԴՆԹ, էթիդիումի բրոմիդ, դիմեթիլսուլֆօքսիդ (ԴՄՍՕ), որոնք ձեռք են բերվել “Sigma” ընկերությունից, իսկ դիէթիլսուլֆօքսիդը (ԴԷՍՕ) և դիպրոպիլսուլֆօքսիդը (ԴՊՍՕ) սինթեզվել և մաքրվել են [5, 6]-ում նկարագրված եղանակով: ԴՆԹ-ի լուծույթը պատրաստվել է ցիտրատային բուֆերում (0,015 M NaCl և 0,0015 M նատրիումի ցիտրատ՝ Na₃C₆H₅O₅·5H₂O), pH 7,5:

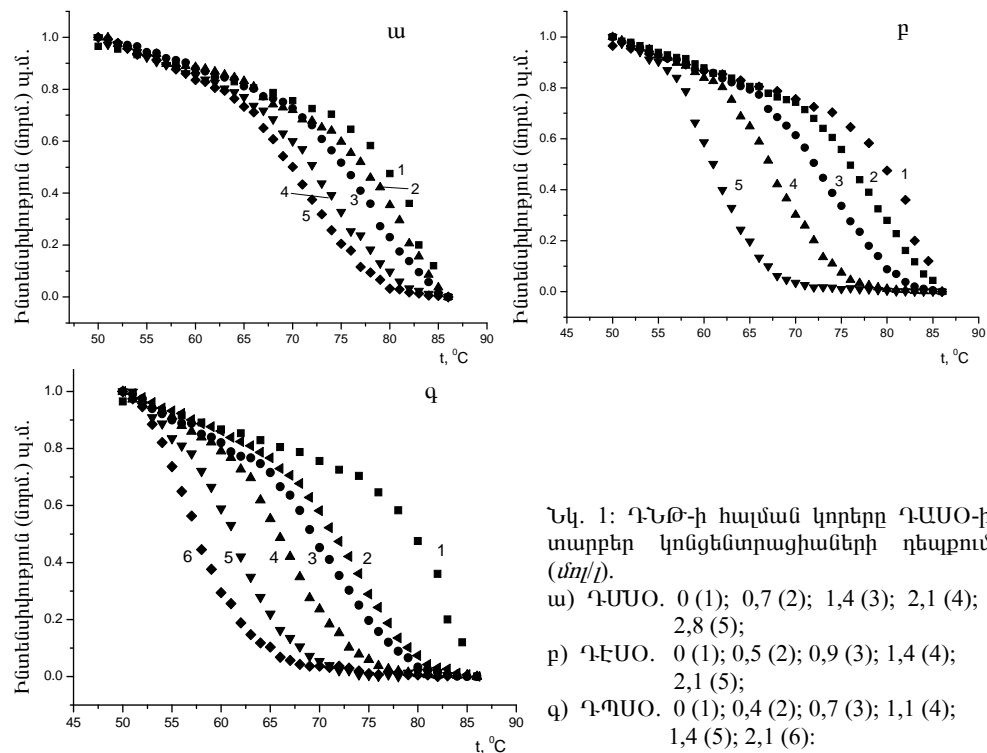
ԴՆԹ-ի լուծույթների պատրաստման համար նախ ստացվել է ԴԱՍՕ-ի համապատասխան կոնցենտրացիայով լուծույթ ցիտրատային բուֆերում, այնուհետև վրան ավելացվել է համապատասխան քանակությամբ էթիդիումի բրոմիդի լուծույթ և խառնվել է մինչև լավ լուծվելը: ԴՆԹ-ի ավելացումից հետո լուծույթի թույլ նարնջագույն երանգը դառնում է վարդագույն: Լուծույթներում ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի կոնցենտրացիաները եղել են համապատասխանաբար

16,5 մկգ/մլ և $23 \cdot 10^{-6}$ U, վերջիններս ճշտվել են էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով՝ SPECORD 50PC սպեկտրոսկոպի օգնությամբ: ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի կլանման մոլային գործակիցները համապատասխանաբար հավասար են $\varepsilon_{260nm}=6600$ և $\varepsilon_{480nm}=5680$ U⁻¹·սմ⁻¹:

Չափումները կատարվել են Varian Cary Eclipse ֆլուորեսցենտային սպեկտրալուսաչափի օգնությամբ 1 սմ լայնությամբ քվարցե կյուվետներում: Գրգռման ալիքի երկարությունն ընտրվել է 520 նմ, իսկ առաքումը դիտարկվել է 585 նմ ալիքի տիրույթում: Չափումները կատարվել են 50–87⁰ C ջերմաստիճանային միջակայքում LAUDA A100 թերմոստատի օգնությամբ: Լուծույթի ջերմաստիճանը անմիջականորեն ֆիքսվել է կյուվետի բաժանմունքում տեղադրված ցուցիչի միջոցով:

ԴՆԹ-ի հալման կորերը մշակվել են Origin 7.5 համակարգչային ծրագրի օգնությամբ, հալման ջերմաստիճանը համապատասխանում է հալման կորի թռիչքի միջնակետին:

Ստացված արդյունքները և դրանց քննարկումը: Պատրաստվել են ԴԱՍՕ-ի տարբեր պարունակությամբ ԴՆԹ-ի լուծույթներ: Դեմատուրացիայի ժամանակ ԴՆԹ-ի երկարաբաշխումը բացման հետ զուգընթաց ազոտական հիմքերի միջև գտնվող ԷԲ-ի մոլեկուլները ԴՆԹ-ի հիդրոֆոբ տիրույթից դուրս են գալիս դեպի լուծիչ, ինչի հետևանքով տեղի է ունենում ԷԲ-ի ֆլուորեսցենտային ինտենսիվության անկում: Կառուցելով ԷԲ-ի ճառագայթման ինտենսիվության կախվածությունը ջերմաստիճանից՝ ստացել ենք ԴՆԹ-ի հալման կորերը, որոնցից կարելի է որոշել ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանը:



Նկ. 1-ում ներկայացված են ԴՆԹ-ի ջերմային դեմատուրացիայի կորերը ԴԱՍՕ-ի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում:

Ինչպես երևում է նկարից, բոլոր երեք դեպքերում էլ, անկախ ավելացվող սուլֆօքսիդի տեսակից, ԳԱՍՕ-ի քանակի մեծացման հետ տեղի է ունենում հալման կորերի տեղաշարժ դեպի ավելի ցածր ջերմաստիճանային մարզ: Սա վկայում է այն մասին, որ դիալկիլսուլֆօքսիդներն ունեն արտահայտված դենատուրացնող հատկություն և լուծույթում դրանց կոնցենտրացիայի մեծացումը հանգեցնում է ԴՆԹ-ի դենատուրացիային ավելի ցածր ջերմաստիճանում: Կարելի է ենթադրել, որ լուծույթում ԳԱՍՕ-ի մոլեկուլները փոխազդեցության մեջ են մտնում ԴՆԹ-ի ներքին տիրույթի ազոտային հիմքերի հետ և շնորհիվ ուժեղ հիդրոֆոր փոխազդեցությունների՝ հեշտացնում են ազոտային հիմքերի միջև ջրածնական կապերի քանդումը: Արդյունքում հեշտանում է նաև ԴՆԹ-ի դենատուրացիան և այն տեղի է ունենում ավելի ցածր ջերմաստիճաններում:

ԴՆԹ-ի հալման կորերից որոշվել են նրա հալման ջերմաստիճանները և ցույց է տրվել, որ ԳԱՍՕ-ի քանակի մեծացումը հանգեցնում է ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի աստիճանական փոքրացմանը:

ԴՆԹ-ի ջերմային դենատուրացիայի վրա հիդրոֆոր փոխազդեցությունների դերը ի հայտ բերելու համար կառուցվել են ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանների սուլֆօքսիդների կոնցենտրացիաներից կախման գրաֆիկները (նկ. 2):

Ինչպես երևում է նկարից, լուծույթում ԳԱՍՕ-ի քանակի աճմանը զուգընթաց հալման ջերմաստիճանը նվազում է գծայնորեն: ԳԱՍՕ-ԳԷՍՕ-ԳՊՍՕ շարքում սուլֆօքսիդի շղթայի երկարացման հետ տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի անկում: Նման վարքը խոսում է այն մասին, որ ԴՆԹ-ի դենատուրացիայի վրա էական ազդեցություն ունեն հիդրոֆոր փոխազդեցությունները: Իրոք,

սուլֆօքսիդների ածխաջրածնային շղթայի երկարացմանը՝ այսինքն, հիդրոֆոր փոխազդեցությունների մեծացմանը զուգընթաց ԴՆԹ-ի ջերմային դենատուրացիան ավելի է հեշտանում և տեղի է ունենում ավելի ցածր ջերմաստիճաններում: Մյուս կողմից, պետք չէ բացառել, որ սուլֆօքսիդների ազդեցությամբ ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի նվազումը կարող է պայմանավորված լինել նաև ջրի կառուցվածքազոյացմամբ [7]:

Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ դիալկիլսուլֆօքսիդները ցուցաբերում են ԴՆԹ-ն դենատուրացնող հատկություն և նրանց ներկայությամբ տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի իջեցում: Մյուս կողմից, ԳԱՍՕ-ԳԷՍՕ-ԳՊՍՕ շարքում սուլֆօքսիդների դենատուրացնող հատկությունն աճում է՝ պայմանավորված սուլֆօքսիդների ածխաջրածնային շղթայի երկարացմամբ և, հետևաբար, հիդրոֆոր փոխազդեցությունների մեծացմամբ:

1. **Gore M.G.** Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach. New York: Oxford University Press, 2000.
2. **Mergny J.L., Lacroix L.** Oligonucleotides, 2003, v. 13, p. 515.
3. **Cheng Y.K., Pettitt B.M.** Prog. Biophys. Molec. Biol., 1992, v. 58, p. 225.
4. **Albani J.R.** Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.
5. **Markarian S.A., Tadevosyan N.** Method of Purification of Diethylsulfoxide. Patent of Republic of Armenia № 1196A2, P 20010041, 2002.
6. **Markarian S.A., Gabrielian L.S., Bonora S.** Spectrochim. Acta A, 2007, v. 68, p. 1296.
7. **Markarian S.A., Asatryan A.M., Zatikyan A.L.** J. Chem. Therm., 2005, v. 37, p. 768.

Մ. Գ. ԱՅՆԱՐՅԱՆ, Ա. Գ. ԽԱՇԱՏՐՅԱՆ, Ս. Ա. ՄԱՐԿԱՐՅԱՆ

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК
В ПРИСУТСТВИИ ДИАЛКИЛСУЛЬФОКСИДОВ МЕТОДОМ
ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Резюме

Методом флюоресцентной спектроскопии изучено влияние диалкилсульфоксидов (ДАСО) на тепловую денатурацию ДНК. В качестве флюоресцентного маркера использован бромистый этидий. Выявлено, что ДАСО проявляет выраженную денатурирующую способность. В ряду ДМСО–ДЭСО–ДПСО с увеличением длины углеводородной цепи сульфоксидов их денатурирующая способность увеличивается, что обусловлено увеличением прямых гидрофобных взаимодействий ДНК–ДАСО.

M. G. AZNAURYAN, A. G. KHACHATRYAN, Sh. A. MARKARIAN

INVESTIGATION OF DNA THERMAL DENATURATION AT THE
PRESENCE OF DIALKYL SULFOXIDES BY FLUORESCENCE
SPECTROSCOPY

Summary

The effect of dialkylsulfoxides (DASO) on the thermal denaturation of DNA was studied by fluorescence spectroscopy. As a fluorescence probe the ethidium bromide was used. It is revealed, that DASO shows expressed denaturing ability. In series of DMSO–DESO–DPSO with increasing of hydrocarbonic chain length of sulfoxides their denaturing ability increases, which is caused by the increase of direct hydrophobic interactions between DNA–DASO.