

Քիմիա

УДК 541.18

Մ. Գ. ԱԶՆԱՌԻՐՅԱՆ

**ԴՆԹ-Ի ՋԵՐՄԱՅԻՆ ԴԵՆԱՏՈՒՐԱՑՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԴԻՍԵԹԻԼՍՈՒԼՖՈՆ+ՋՈՒՐ ԵՎ ԴԻԷԹԻԼՍՈՒԼՖՈՆ+ՋՈՒՐ ԽԱՌԸ
ԼՈՒԾԻՉՆԵՐՈՒՄ**

Ներածություն: ԴՆԹ-ի պարույր-կծիկ անցումը կամ դենատուրացումը մշտապես տեղի է ունենում կենդանի օրգանիզմում ԴՆԹ-ի տրանսկրիպցիայի և ռեպլիկացիայի ժամանակ: Ապացուցված է, որ երկպարույր ԴՆԹ-ի կայունությունը լավագույնս ապահովվում է ջրային միջավայրում և նվազում է ջուր-օրգանական խառը լուծիչների առկայությամբ [1, 2]: ԴՆԹ-ն դենատուրացնող հայտնի ազեոնները, ինչպիսիք են միզանյութը, ֆորմամիդը, դիմեթիլսուլֆոքսիդը և մեթանոլը, նվազեցնում են ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանը [3, 4]: Այս երևույթը մասնավորապես օգտագործվում է էլեկտրաֆորեզի և պոլիմերացման շղթայական ռեակցիայի իրականացման ժամանակ՝ ԴՆԹ-ի ջերմակայունությունը նվազեցնելու նպատակով [5–7]:

Մեր նախկին աշխատանքներում ուսումնասիրվել է դիպլիլսուլֆոքսիդների ազդեցությունը ԴՆԹ-ի դենատուրացման վրա և բացահայտվել է հիդրոֆոր փոխազդեցությունների դերը այդ գործընթացում [8–10]:

Այս աշխատանքում էլեկտրոնային կլանման, ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի և խտաչափության մեթոդներով ուսումնասիրվել է ԴՆԹ-ի դենատուրացումը դիմեթիլսուլֆոնի (DMSO) և դիէթիլսուլֆոնի (DES) ներկայությամբ:

Օգտագործված նյութերը և հետազոտման եղանակը: Կատարված ուսումնասիրություններում օգտագործվել են հորթի քիմուսի ԴՆԹ (42% dG-dC), DMSO , DES և էթիլումի բրոմիդ (ԷԲ), որոնք ձեռք են բերվել Sigma ընկերությունից: Բոլոր լուծույթները պատրաստվել են ցիտրատային բուֆերում ($0,015 \text{ M NaCl}$ և $0,0015 \text{ M}$ նատրիումի ցիտրատ՝ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$), pH 7,5:

Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիական ուսումնասիրությունների համար նախ ստացվել է DMSO -ի կամ DES -ի տարբեր կոնցենտրացիաներով լուծույթներ ցիտրատային բուֆերում: Ֆլուորեսցենտային հետազոտությունների համար ստացված լուծույթին ավելացվել է համապատասխան քանակությամբ էթիլումի բրոմիդի լուծույթ, խառնվել է մինչև լավ լուծվելը, այնուհետև ավելացվել է ԴՆԹ-ի լուծույթ: Լուծույթներում ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի կոնցենտրացիաները ճշտվել են էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով և կազմել են համապատասխանաբար $16,5 \text{ մկգ/մլ}$ և $23\cdot 10^{-6} \text{ M}$,

ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի կլանման մոլային գործակիցները համապատասխանաբար եղել են $\varepsilon_{260 \text{ նմ}}=6600$ և $\varepsilon_{480 \text{ նմ}}=5680 \text{ U}^{-1} \cdot \text{նմ}^{-1}$:

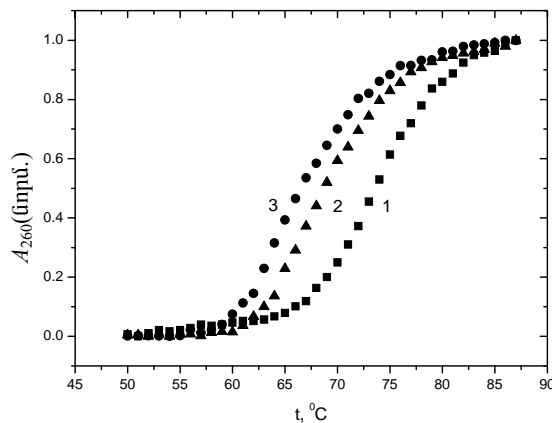
Կատարված ուսումնասիրություններում օգտագործվել են Specord 50PC և Varian Cary Eclipse ֆլուորեսցենտային սպեկտրալուսաչափերը՝ 1 նմ լայնությամբ քվարցե կյովետների օգտագործմամբ: Ֆլուորեսցենտային չափումների ժամանակ ԷԲ-ի գրգռման ալիքի երկարությունը ընտրվել է 520 նմ, իսկ առաքումը դիտարկվել է 585 նմ ալիքի երկարությամբ: Չափումները կատարվել են 50–87⁰C ջերմաստիճանային տիրույթում, ինչը կարգավորվել է Lauda A100 թերմոստատի օգնությամբ: Լուծույթի ջերմաստիճանը անմիջականորեն ֆիքսվել է թվային ջերմաստիճանային ցուցիչի միջոցով:

ԴՆԹ-ի հալման կորերը մշակվել են Origin 8.0 համակարգչային ծրագրի օգնությամբ:

Խտաչափական ուսումնասիրությունները կատարվել են DMA 4500, Anton Paar տատանողական-ռեզոնանսային խտաչափի միջոցով 20–70⁰C ջերմաստիճանային տիրույթում: Խտաչափի չափման ճշտությունը խտության և ջերմաստիճանի համար կազմում են համապատասխանաբար $\pm 5 \cdot 10^{-5} \text{ գ/նմ}^3$ և $\pm 0,01^0\text{C}$:

Ստացված արդյունքները և դրանց քննարկումը:

ՈւՄ սպեկտրալ ուսումնասիրություններ: ԴՄՍՕ₂-ի ներկայությամբ ԴՆԹ-ի դենատուրացումը ուսումնասիրվել է էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով: ԴՆԹ-ի հալման կորերը ստացվել են նրա օպտիկական խտության ջերմաստիճանային կախման կորերից: Օպտիկական խտությունները չափվել են ԴՆԹ-ի կլանման մաքսիմումին (260 նմ) համապատասխանող ալիքի երկարության տակ: Հալման կորերը բնութագրվում են տիպիկ սիգմոիդալ (միաստիճան) տեսքով (նկ. 1): Վերը նշվածը թույլ է տալիս ԴՆԹ-ի դենատուրացումը նկարագրել երկու վիճակների մոդելով (two-state model) և հալման պրոցեսի համար կիրառել վանտ Հոֆի հավասարումը:



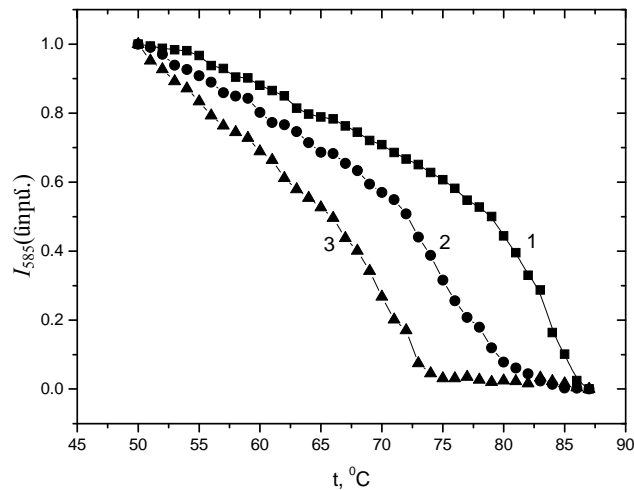
Նկ. 1: ԴՆԹ-ի հալման կորերը լուծույթում դիմեթիլսուլֆոնի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում (մոլ/լ). 0 (1); 0,7 (2); 1,4 (3):

ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանները որոշվում են հալման կորի թռիչքի միջնակետից, իսկ անցման էնթալպիաները՝ վանտ Հոֆի հավասարումից.

$$\Delta H_{vH} = 6RT_m^2(\partial\alpha / \partial T)_{T=T_m},$$

որտեղ $\alpha = 0,5$, իսկ $(\partial\alpha/\partial T)_{T=T_m}$ անդամը բնութագրվում է հալման կորի թեքությամբ:

Ֆլուորեսցենտային ուսումնասիրություններ: G-UCO_2 -ի ներկայությամբ G-ND -ի դենատուրացումը ուսումնասիրվել է ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով, քանի որ դիէթիլսուլֆոնի կլանման սպեկտրը վերադրվում է G-ND -ի սպեկտրի վրա և թույլ չի տալիս տարրալուծել G-ND -ին համապատասխանող կլանման արժեքները: Հետազոտության ընթացքում հետևել ենք G-ND -ի արտաքին նշանակիր՝ էթիդիումի բրոմիդի ֆլուորեսցենտային ազդանշանին: G-ND -ի դենատուրացման ժամանակ G-ND -ի երկայարայի բացմանը զուգընթաց ազոտական հիմքերի միջև տեղաբաշխված E-F -ի մոլեկուլները դուրս են գալիս G-ND -ի հիդրոֆոբ տիրույթից դեպի լուծիչ: G-ND -ի հետևանքով տեղի է ունենում E-F -ի ֆլուորեսցենտային ինտենսիվության անկում, որը պայմանավորված է ջրի մոլեկուլների մարող ազդեցությամբ: E-F -ի ինտենսիվության ջերմաստիճանից կախման կորերից ստացվում են G-ND -ի հալման կորերը, որոնցից որոշվել են G-ND -ի հալման ջերմաստիճանները (նկ. 2):



Նկ. 2: G-ND -ի հալման կորերը լուծույթում դիէթիլսուլֆոնի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում ($d\alpha/dT$). 0 (1); 0,5 (2); 1,0 (3):

Ինչպես տեսնում ենք, երկու դեպքում էլ, անկախ ավելացվող սուլֆոնի տեսակից, վերջինիս քանակի մեծացման հետ տեղի է ունենում հալման կորերի տեղաշարժ դեպի ավելի ցածր ջերմաստիճանային մարզ: Սա վկայում է այն մասին, որ սուլֆոնները ունեն արտահայտված դենատուրացնող հատկություն և լուծույթում դրանց կոնցենտրացիայի մեծացումը հանգեցնում է G-ND -ի դենատուրացմանը ավելի ցածր ջերմաստիճանում: Սուլֆոնների դենատուրացնող հատկությունը կարելի է բացատրել G-ND -ի և սուլֆոնի մոլեկուլների միջև ուժեղ հիդրոֆոբ փոխազդեցությամբ, մյուս կողմից՝ դրան կարող են նպաստել նաև սուլֆոնների ազդեցությամբ ջրի կառուցվածքային փոփոխությունները:

G-ND -ի հալման կորերից որոշվել են նրա հալման ջերմաստիճանները և անցման էնթալպիաների արժեքները և ցույց է տրվել, որ սուլֆոնների

քանակի մեծացումը հանգեցնում է դրանց աստիճանական փոքրացմանը (աղյ. 1):

Աղյուսակ 1

ԳՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանների և վանտ Հոֆի էնթալպիաների արժեքները կախված լուծույթում սուլֆոնների կոնցենտրացիայից

Սուլֆոն	Կոնցենտրացիա, մոլ/լ	$T_m, ^\circ C$	$\Delta H_{vH}, կՋ/մոլ$
ԳՄՍՕ ₂ (ելեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդ)	0	77,75	472,95
	0,7	70,57	443,22
	1,2	67,50	393,63
	1,4	66,60	374,28
	2,1	58,20	284,26
ԳԷՍՕ ₂ (ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդ)	0,35	76,50	–
	0,5	73,10	–
	0,7	70,12	–
	1,0	65,82	–

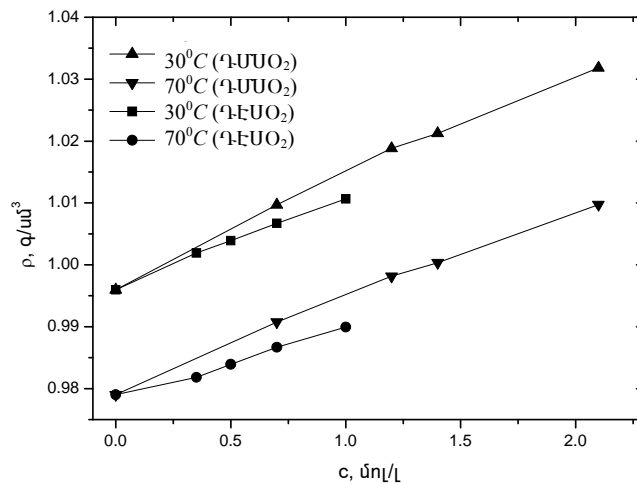
Համեմատության համար բերենք միևնույն կոնցենտրացիայով (0,7 մոլ/լ) դիմեթիլ- և դիէթիլսուլֆոքսիդների համար ստացված արդյունքները. ԳՄՍՕ-ի դեպքում $T_m=71,77^\circ C$ [8], իսկ ԳԷՍՕ-ի դեպքում $T_m=73,56^\circ C$ [10]: Սուլֆոքսիդների համեմատ սուլֆոնների հալման ջերմաստիճանի ավելի փոքր արժեքները կարող են պայմանավորված լինել $>SO_2$ խմբի ազդեցությանը: Ինչպես հայտնի է, սուլֆոքսիդների համեմատ սուլֆոնները ունեն ավելի մեծ դիպոլ մոմենտ, որի պատճառով փոքրանում է վերջինիս ջրի կառուցվածքը կայունացնելու ունակությունը, ինչն էլ կարող է հանգեցնել ԳՆԹ-ի կայունության նվազմանը:

Խտաչափական ուսումնասիրություններ: Չափումները կատարվել են տատանողական-ռեզոնանսային խտաչափության մեթոդով: Աղյ. 2-ում ներկայացված են ԳՆԹ-ի լուծույթների խտության արժեքները կախված լուծույթում ԳՄՍՕ₂-ի և ԳԷՍՕ₂-ի քանակից և ջերմաստիճանից: Պետք է նշել, որ, ի տարբերություն ԳՄՍՕ₂-ի, ԳԷՍՕ₂-ի լուծելիությունը սահմանափակ է՝ առավելագույնը մինչև 1 մոլ/լ: Արդյունքներից երևում է, որ երկու դեպքում էլ լուծույթները ցուցաբերում են միանման վարք և ջերմաստիճանի բարձրացման հետ տեղի է ունենում համակարգի խտության նվազում:

Նկ. 3-ում բերված են ԳՄՍՕ₂ և ԳԷՍՕ₂ պարունակող ԳՆԹ-ի լուծույթների խտությունների կախումը ավելացվող սուլֆոնների կոնցենտրացիայից երկու ջերմաստիճանում. $30^\circ C$ ՝ մինչև ԳՆԹ-ի դեմատուրացումը և $70^\circ C$ ՝ ԳՆԹ-ի դեմատուրացումից հետո: Ինչպես երևում է նկարից, երկու ջերմաստիճանում էլ ԳՄՍՕ₂ պարունակող լուծույթների համար $\rho = f(c)$ կախվածությունը ուղղագծային է: Նույնը կարելի է ասել նաև ԳԷՍՕ₂ պարունակող լուծույթների համար, որոնց դեպքում $\rho = f(c)$ կախվածության թեքությունը ավելի փոքր է: Այս դեպքում կորի հետագա ընթացքի մասին դժվար է դատել ԳԷՍՕ₂-ի փոքր լուծելիության պատճառով:

ԳՆԹ+ԳՄՍՕ₂+ջուր և ԳՆԹ+ԳԷՍՕ₂+ջուր համակարգերի խտությունները (գ/սմ³) 20–70°C ջերմաստիճանային տիրույթում

t, °C	[ԳՄՍՕ ₂], մոլ/լ				[ԳԷՍՕ ₂], մոլ/լ			
	0,7	1,2	1,4	2,1	0,35	0,5	0,7	1,0
20	1,01296	1,02268	1,02516	1,03614	1,00477	1,00692	1,00987	1,01248
25	1,01128	1,02074	1,02335	1,03402	1,00343	1,00557	1,00838	1,01066
30	1,00967	1,01893	1,02134	1,03181	1,00192	1,00393	1,00670	1,00865
35	1,00786	1,01692	1,01933	1,02939	1,00021	1,00222	1,00477	1,00646
40	1,00580	1,01469	1,01699	1,02712	0,99820	1,00011	1,00273	1,00412
45	1,00359	1,01228	1,01455	1,02449	0,99619	0,99793	1,00048	1,00160
50	1,00143	1,00972	1,01195	1,02173	0,99377	0,99559	0,99803	0,99901
55	0,99905	1,00702	1,00922	1,01885	0,99122	0,99310	0,99552	0,99636
60	0,99647	1,00421	1,00634	1,01604	0,98874	0,99045	0,99280	0,99326
65	0,99373	1,00124	1,00333	1,01290	0,98519	0,98720	0,98975	0,98997
70	0,99078	0,99816	1,00035	1,00974	0,98182	0,98394	0,98670	0,98726



Նկ. 3: ԳՆԹ-ի լուծույթների խտության կախումը ավելացվող ԳՄՍՕ₂-ի և ԳԷՍՕ₂-ի կոնցենտրացիաներից՝ 30°C և 70°C ջերմաստիճաններում

Այսպիսով, կատարված հետազոտությունները հաստատում են ԳՄՍՕ₂-ի և ԳԷՍՕ₂-ի ԳՆԹ-ն դեմատուրացնող հատկությունները և այդ գործընթացում հիդրոֆոր փոխազդեցությունների դերը:

Ֆիզիկական և կոլոիդ քիմիայի ամբիոն

Ստացվել է 28.06.2010

Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1. Bonner G., Klibanov A.M. Biotech. & Bioeng., 2000, v. 68, p. 339.
2. De Xammar Oro J.R., Grigera J.R. J. Biol. Phys., 1995, v. 21, p. 151.
3. Escara J.F., Hutton J.R. Biopolymers, 1980, v. 19, p. 1315.

4. **Hutton J.R.** Nucl. Acid Res., 1977, v. 4, p. 3537.
5. **Hammouda B., Worcester D.** Biophysical Journal, 2006, v. 91, p. 2237.
6. **Varadaraj K., Skinner D.M.** Gene, 1994, v. 140, p. 1.
7. **Baskaran N., Kandpal R.P., Bhargava A.K., Glynn M.W., Bale A., Weissman S.M.** Genome Res., 1996, v. 6, p. 633.
8. **Markarian S.A., Asatryan A.M., Grigoryan K.R., Sargsyan H.R.** Biopolymers, 2006, v. 81, p. 1.
9. **Aznauryan M.G., Markarian S.A.** J. Sol. Chem., 2010, v. 39, p. 43.
10. **Ազնաւորյան Մ.Գ., Խաչատրյան Ա.Գ., Մարգարյան Շ.Ա.** ԵՊՀ Գիտական տեղեկագիր, Քիմիա և կենսաբանություն, 2010, № 1, էջ. 8.

М. Г. АЗНАУРЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК В СМЕШАННЫХ
РАСТВОРИТЕЛЯХ ДИМЕТИЛСУЛЬФОН+ВОДА И
ДИЭТИЛСУЛЬФОН+ВОДА

Резюме

Методами УФ, флюоресцентной спектроскопии и денсиметрии изучено влияние диметил- и диэтилсульфонов на термическую денатурацию ДНК. Выявлено, что сульфоны проявляют выраженную денатурирующую способность, которая повышается с увеличением углеводородной цепи сульфонов, что свидетельствует о вкладе гидрофобных взаимодействий.

M. G. AZNAURYAN

INVESTIGATION OF DNA THERMAL DENATURATION IN MIXED
SOLVENTS DIMETHYLSULFONE+WATER AND
DIETHYLSULFONE+WATER

Summary

The effect of dimethyl- and diethylsulfones on the thermal denaturation of DNA was studied by UV/vis, fluorescence spectroscopy and densimetry. It is revealed, that sulfones show expressed denaturing ability. The denaturing ability of sulfones increases with the increasing of carbon chain length of sulfones, which indicates the contribution of hydrophobic interactions.