

УДК 519.9

Ковалюк О.М.¹, студ.,
Терентьєва Ю. Г.², к.ф.-м.н., доц.

O. M. Kovaliuk¹, stud.,
Y. G. Terentyeva², PhD.

Взаємодія барвника Pyronin Y(G) з полінуклеотидами

The polynucleotides – Pyronin Y(G) interaction studying

^{1,2}Київський національний університет імені
Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул.
Володимирська 64/13,
e-mail: ¹kovaliukoleksandr@gmail.com,
²juliater@i.ua

^{1,2}Taras Shevchenko National University of Kyiv,
01601, Kyiv, Volodymyrska st. 64/13,
e-mail: ¹kovaliukoleksandr@gmail.com,
²juliater@i.ua

Досліджувалася взаємодія барвника Pyronin Y(G) з полінуклеотидами (ДНК, РНК) у водному розчині, виявлено ефект затухання флюоресценції як результат взаємодії полінуклеотидів з барвником. Було обчислено вплив концентрації полінуклеотидів на оптичну густину водного розчину барвник-полінуклеотид. Виявлено, що зміна оптичної густини у водному розчині ДНК-барвник є меншою, ніж в такому ж РНК-барвник. Взаємодію між молекулами барвника та різними базами РНК змодельовано за допомогою програмного пакету HyperChem Professional 8. Встановлено просторові конфігурації взаємних положень молекул барвника та баз, які відповідають найбільшим енергіям взаємодії. Експериментально виявлено та теоретично підтверджено гасіння флюоресценції барвника винятково пуриновими азотистими основами.

Ключові слова: полінуклеотиди, барвник, флюоресценція, азотисті основи.

Researched the interaction of dye Pyronin Y (G) with the polynucleotides (DNA, RNA) in water solution. The effect of the quenching of fluorescence as a result of interaction with the dye polynucleotides. The degree of quenching depends of the impurity concentration of RNA or DNA. Calculated concentration influence on polynucleotides optical density of the water solution of the dye-polynucleotide. Found the change in optical density in water solution DNA-dye is less than in the same RNA- dye. Experimentally show that optical absorption spectra of an water solute of dye and fluorescence excitation of an water solute of PY * RNA same, so the current optical center belongs dye. Excitation spectra and fluorescence emission spectra is "mirrored." Fluorescence quenching correlates with a decrease optical density. The excitation from molecules Pyronin Y to molecule RNA or DNA isn't passed. The interaction between dye molecules and various RNA bases simulated by the software package HyperChem Professional 8. Established mutual spatial configuration of the positions of the dye molecules and RNA bases where the highest energies of interaction. Discovered experimentally and theoretically confirmed by fluorescence quenching dye only purine nitrogenous bases.

Key Words: polynucleotides, dye, fluorescence, nucleobases.

Статтю представив д.ф.-м.н., проф. Макарець М. В.

Вступ

Барвник Pyronin Y(G) широко використовується у цитохімії задля флюоресцентної візуалізації [1] та ідентифікації полінуклеотидів. ДНК і РНК забезпечують зберігання, передачу і реалізацію генетичної інформації організму [2] й функціонування живих клітин, що робить будь-яке відкриття пов'язане з ними вагомим для світу. Важливими є спектроскопічні дослідження вибіркової взаємодії барвника Pyronin Y з ДНК і РНК, оскільки спектральний прояв ДНК та РНК дуже

подібний і відрізняється лише при взаємодії з барвником.

Pyronin Y(G) – катіонний барвник [3], структурна формула якого $C_{12}H_{19}N_2O$ показана на рис.1. Максимум смуги поглинання барвника відповідає довжині хвилі 565 нм (крива 1, рис.2).

Експериментальні дослідження та матеріали

Спектри поглинання одержані на серійному двопробеновому спектрофотометрі Specord UV-VIS. Запис спектрів поглинання розчинів проводився в стандартних кварцевих кюветах

товщиною 1 см (діапазон пропускання 170-1000 нм). Похибка запису хвильових чисел становила за паспортом 20 см^{-1} .

Спектри флюоресценції вимірювались на серійному спектрофлюориметрі Cary Eclipse (Varian Inc., Agilent Tech). Максимальна роздільна здатність приладу Cary Eclipse - 1,5 нм, що визначається апаратною функцією та найменшою шириною щілини. Але оскільки досліджувані смуги люмінесценції досить широкі (~50 нм), то обрана спектральна ширина щілини для вимірів становила 10 нм. Похибка визначення інтенсивності не перевищує 1%. Для спектральних вимірювань використовували стандартні кварцеві кювети розміром $1 \times 1 \text{ см}$.

Результати та обговорення

Виміряно збудження і випромінювання флюоресценції чистого барвника та при додаванні РНК. При концентрації РНК 1,9 г/л у розчині спостерігалось зменшення інтенсивності флюоресценції на 33%.

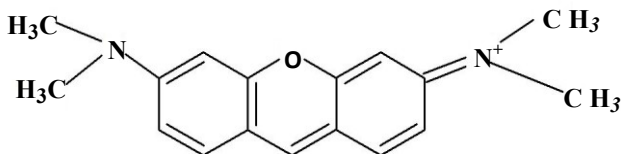


Рис. 1. Структурна формула Ruyonin Y(G).

Виміряно поглинання чистого барвника і з додаванням РНК. Спектри поглинання та флюоресценції показані на рис.2. Спектри поглинання та збудження флюоресценції для чистого барвника та при додаванні РНК відповідають один одному. Спектри збудження та випромінювання флюоресценції “дзеркальні”. Отже, діючий оптичний центр єдиний і належить барвнику, передача збудження між барвником і полінуклеотидами не відбувається. Ступінь гасіння флюоресценції корелює зі ступенем зменшення оптичної густини в розчині барвника з РНК або ДНК (криві 1-4, рис.2).

Досліджено залежність оптичної густини розчину барвника та полінуклеотидів від концентрації полінуклеотидної компоненти (рис.3,4).

Контроль концентрації полінуклеотидів здійснювався стандартним методом вимірювання оптичної густини на довжині хвилі 260нм (залежності поглинання від концентрації – кр. 1 для РНК, кр. 2 для ДНК, рис.5).

Знайдена кількісна залежність максимуму оптичної густини барвника від концентрації РНК та ДНК в розчині з барвником, що показана на рис.5.

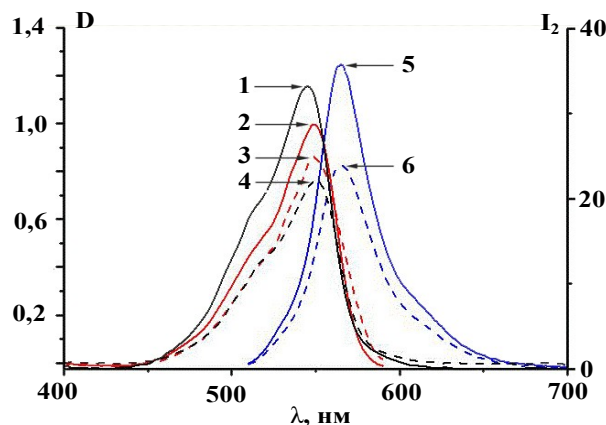


Рис. 2. Спектри збудження (2,3) та випромінювання (5,6) флюоресценції – їм відповідає ліва вісь ординат (D); спектри поглинання (1,4) для чистого Ruyonin Y (1,2,5) та при додаванні у розчин РНК (3,4,6).

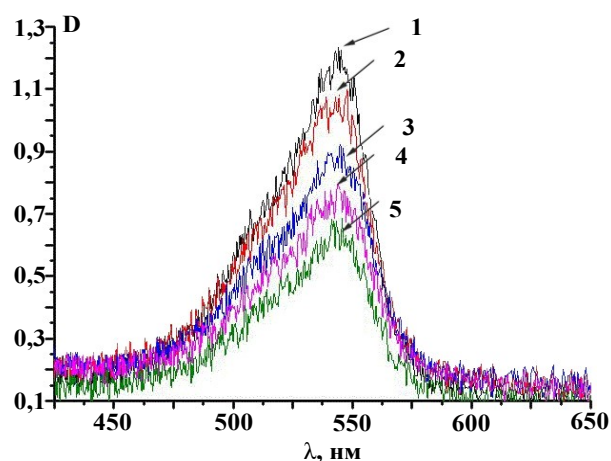


Рис. 3. Спектри поглинання чистого Ruyonin Y (1) та з додаванням РНК за різних концентрацій: 0,31г/л – 2, 1,25г/л – 3, 2,50г/л – 4, 5,00г/л – 5.

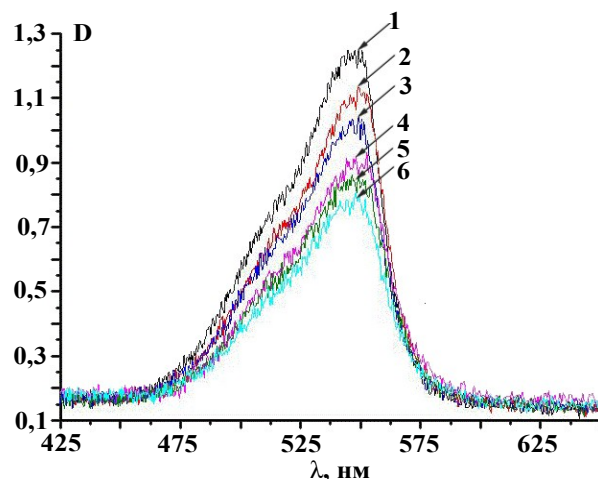


Рис. 4. Спектри поглинання чистого Ruyonin Y (1) та з додаванням ДНК за різних концентрацій: 3,06г/л – 2, 5,71г/л – 3, 8,04г/л – 4, 10,10г/л – 5, 11,93г/л – 6.

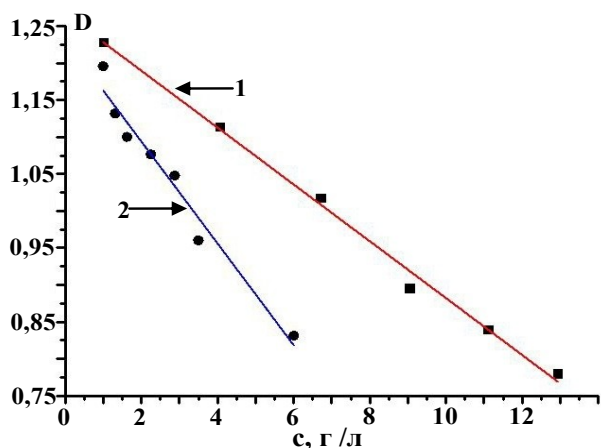


Рис. 5. Залежність максимуму смуги поглинання Ругонін Y від концентрації РНК(2, круглі точки) та ДНК(1, квадратні точки).

Для обох полінуклеотидів прослідковується лінійна залежність. Отже, в першому наближенні підтверджується закон Бугера. Оскільки діючий оптичний центр у розчині відповідає Ругонін Y та перенесення збудження немає, то гасіння флюоресценції корелює з зменшенням оптичної густини при додаванні полінуклеотидів.

Розрахунки

За допомогою програмного пакету HyperChem Professional 8 були зроблені розрахунки для взаємодії молекули Ругонін Y з РНК. Енергетична структура РНК складається з суперпозиції енергетичних структур нуклеозидів [4] молекули, тому розглядали взаємодію барвника окремо з кожною з основ РНК. Припускалося, що має місце стекова диполь-дипольна взаємодія. Напівемпіричним методом AM1 були знайдені положення з найбільшими енергіями взаємодій, які показані на рис.7-10. Молекули розташовувалися так, щоб їх диполі були антипаралельними (приклад для взаємодії барвника з аденіном на рис.6).

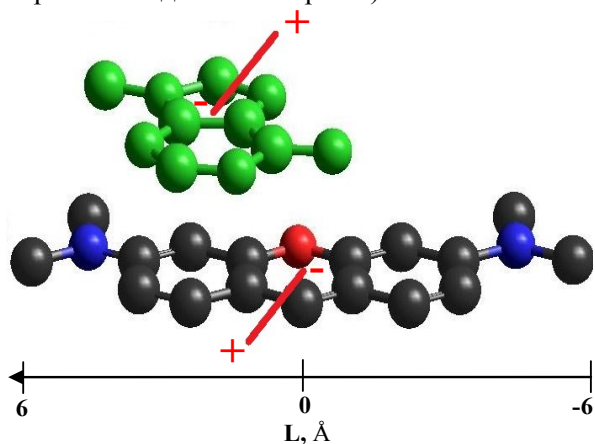


Рис. 6. Взаєморозташування диполів Ругонін Y та аденіну.

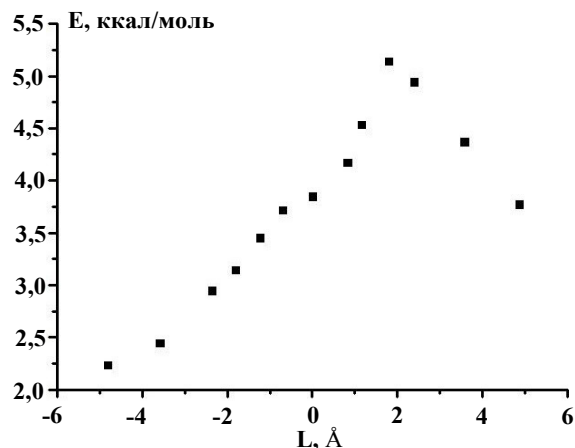


Рис. 7. Залежність енергії взаємодії від відстані горизонтального зміщення молекул Ругонін Y та аденіну.

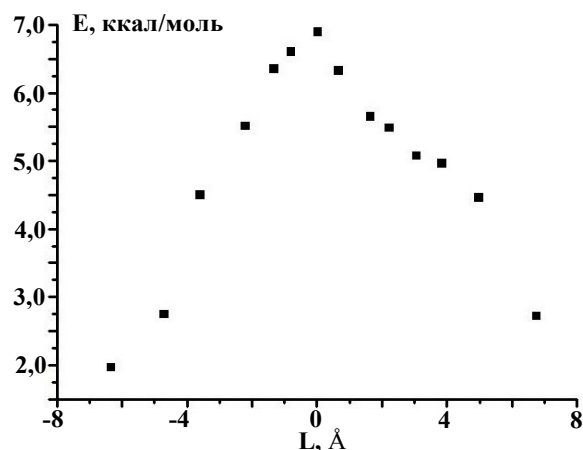


Рис. 8. Залежність енергії взаємодії від відстані горизонтального зміщення молекул Ругонін Y та гуаніну.

В результаті обчислення отримано, що найбільша енергія взаємодії відповідає парі Ругонін Y-гуанін. Це зумовлено тим, що для неї найбільша площа перекриття електронних хмар. Для положень, де енергія взаємодії найбільша було розраховано сили осцилятора напівемпіричним методом ZINDO/S. Отримали для взаємодії з аденіном та гуаніном для переходу HOMO-LUMO малі енергії осциляцій ($f = 0,1455$ і $f = 0,0333$ відповідно). Отже, ці переходи заборонені, що підтверджується фактом гасіння флюоресценції. При взаємодії з цитозином ($f = 0,759$) і урацилом ($f = 0,7356$) відповідні електронні переходи дозволені.

Напівемпіричним методом ZINDO/S були розраховані молекулярні орбіталі та розподіл електронної густини при взаємодії барвника з кожною з основ. При взаємодії Ругонін Y з аденіном та гуаніном верхні зайняті молекулярні орбіталі цих основ лежать між верхньою зайнятою та нижньою вакантною орбіталями барвника.

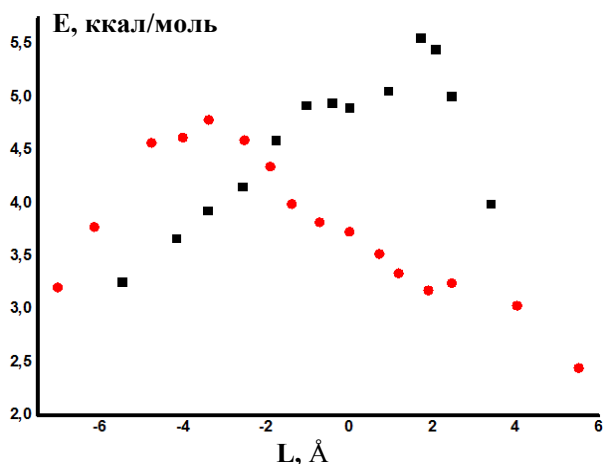


Рис. 9. Залежність енергії взаємодії від відстані горизонтального зміщення молекул цитозину (круглі точки) і урацилу (квадратні точки) відносно Рупонін У.

Отже, відстань між зайнятими і вакантними орбіталями в результаті взаємодії пуринових баз з барвником зменшується. Для цитозину та урацилу такий факт відсутній, тому флюоресценція така ж як і чистого барвника.

Висновки

В результаті взаємодії Рупонін У з полінуклеотидами має місце ефект гасіння флюоресценції. Ступінь гасіння лінійним чином залежить від концентрації домішки РНК чи ДНК,

тобто, в першому наближенні підтвердилося підпорядкування фізичного механізму поглинання закону Бугера. При взаємодії з ДНК ефект проявляється значно менше. Взявши еталоном гасіння з ДНК та з РНК, як повністю денатурованої ДНК можна проградувати шкалу, за якою можливо визначати ступінь денатурованості молекули ДНК.

Експериментально показано, що спектри оптичного поглинання водного розчину чистого барвника та збудження флюоресценції водного розчину РУ*РНК співпадають, тому діючий оптичний центр належить барвнику. Спектри збудження та випромінювання флюоресценції суміші є "дзеркальними". Гасіння флюоресценції корелює зі зменшенням оптичної густини. Отже, збудження з молекули Рупонін У на молекулу РНК або ДНК не передається.

Отримано, що гасять флюоресценцію барвника Рупонін У саме пуринові основи (аденін, гуанін) внаслідок того, що їхні верхні зайняті орбіталі лежать між нижніми вакантними та верхніми зайнятими орбіталями барвника, що при їх взаємодії зумовлює зменшення енергетичної відстані між зайнятими і вакантними орбіталями.

Список використаних джерел

1. Миронова В.М. Цитологічний аналіз / В.М. Миронова, Н.В. Барикіна, О.В. Застєпіна // Cytological Analysis of the Response of Nucleolar RNA and RNA_Binding Proteins to Oxidative Stress in HeLa Cells, 2014, Cell and tissue biology. – 2014. – P. 4,6. Доступна: <https://www.researchgate.net>. [Добавлена: Лютий 2015].
2. Уотсон Дж. Двойная спираль / Дж. Уотсон – Нью-Йорк: Харвесті, 2013 – 30-53 с.
3. Конарев В.Г. Методи біохимии и цитохимии нуклеиновых кислот / В.Г. Конарев, С.Л. Тютюрев.– Ленинград: Колос, 1970. – 149-164 с.
4. Ящук В.М. Фотоніка полімерів / В.М. Ящук. – Київ: ВПЦ, 2004. – 23,24 с.

References

1. MIRONOVA, A., BARYKINA, N. and ZASTEPINA, O. (2014) *Cytological Analysis of the Response of Nucleolar RNA and RNA_Binding Proteins to Oxidative Stress in HeLa Cells*. Ed.: Cell and tissue biology, p.4,6. Available from: <https://www.researchgate.net>. [Accessed: February 2015].
2. WATSON, J. (2013) *The double helix*. Ed. New York: Harvesting. p. 30-53.
3. KONAREV, V., TUTUREV S. (1970) *Methods of biochemistry and cytochemistry nucleinic acids*. Ed. Kyiv: Kolos. p. 149-164.
4. YASHCHUK, V. (2004) *Photonics of polymers*. September 2007. Ed. Kyiv: Vydavnycho-polihrafichnyj centr Kyuyivskij universytet. p. 23-24.

Надійшла до редколегії 10.09.16