

УДК 573.3

ГИПОХРОМИЗМ ДЕГАЗИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ ДНК

Пивоваренко Ю.В.

НУЦ «Физико-химическое материаловедение»

Киевского национального университета им. Тараса Шевченко и НАН Украины, Киев,

e-mail: y.pivovarenko@gmail.com

Показано, что дегазация или насыщение водородом водных растворов ДНК сопровождаются уменьшением их A_{260} .

Ключевые слова: гипохромизм ДНК.

HYPOCHROMISM OF DEGAS DNA SOLUTIONS

Pivovarenko Yu.V.

STC Physico-Chemical Center of Material Science, Taras Shevchenko Kyiv National University

and NAS of Ukraine, Kiev, e-mail: y.pivovarenko@gmail.com

It is shown that degassing or hydrogenation of DNA aqueous solutions accompanied by reduction their A_{260} .

Keywords: hypochromism DNA.

Введение

Изучая взаимодействия между ДНК и катионными N-оксидфеназинами в водных растворах с различным газовым составом, мы обнаружили, что такие взаимодействия происходят в дегазированных растворах и в растворах, насыщенных водородом, но не происходят в растворах, насыщенных кислородом [5]. Проанализировав полученные результаты, мы предположили, что растворенные газы могут влиять не только на изучавшиеся нами взаимодействия, но и на состояние ДНК в водных растворах.

Цель исследования

Целью настоящего исследования было:

1. получение УФ-спектров поглощения дегазированных растворов ДНК, а также – растворов ДНК, насыщенных водородом;
2. сравнение полученных спектров с известными УФ-спектрами поглощения растворов ДНК, насыщенных кислородом [6–8].

Материал и методы исследования

В работе использовали растворы тимусной ДНК теленка (Serwa, Германия), приготовленные на 50 мМ Na-какодилатном буфере, pH 6,9 [2].

Для дегазации, растворы ДНК (20°C) в течение 1 час выдерживали в вакуумном эксикаторе под давлением ~ 13 мм рт. ст.

Насыщенные водородом растворы ДНК получали барботированием (водородом) дегазированных растворов ДНК.

Для регистрации УФ-спектров поглощения растворов ДНК использовали спектрофотометры Specord UV VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) и Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Германия).

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что УФ-спектры поглощения дегазированных или насыщенных водородом растворов ДНК со временем претерпевают гипохромные сдвиги, которые сопровождаются уменьшением или полным исчезновением пика с максимумом на длине волны 260 нм (рис. 1, 2).

Известно [6–8], что насыщение растворов ДНК кислородом сопровождается увеличением их A_{260} . Такой гиперхромизм объясняют одноэлектронным окислением ДНК синглетным кислородом [9] и образованием ее комплекса с супероксид-анионом, $\text{ДНК}^+\cdot\text{O}_2^-$, продуктом восстановления синглетного кислорода [6–8]. Исходя из предложенного объяснения природы кислород-зависимого гиперхромизма растворов ДНК, можно предположить, что гипохромизм дегазированных (рис. 1) или насыщенных водородом растворов ДНК (рис. 2) отражает процесс восстановления ДНК и, как следствие, разрушения ее комплекса с супероксид-анионом: $\text{ДНК}^+\cdot\text{O}_2^- + e^- \rightarrow \text{ДНК} + \text{O}_2^-$.

Дегазированные водные растворы приобретают восстановительные свойства при вакуумировании, вследствие активного испарения, происходящем при пониженном парциальном давлении паров воды: поскольку водяной пар всегда заряжен положительно [3], испарение водных растворов неминуемо сопровождается появлением у них отрицательного потенциала и, как следствие, восстановительных свойств.

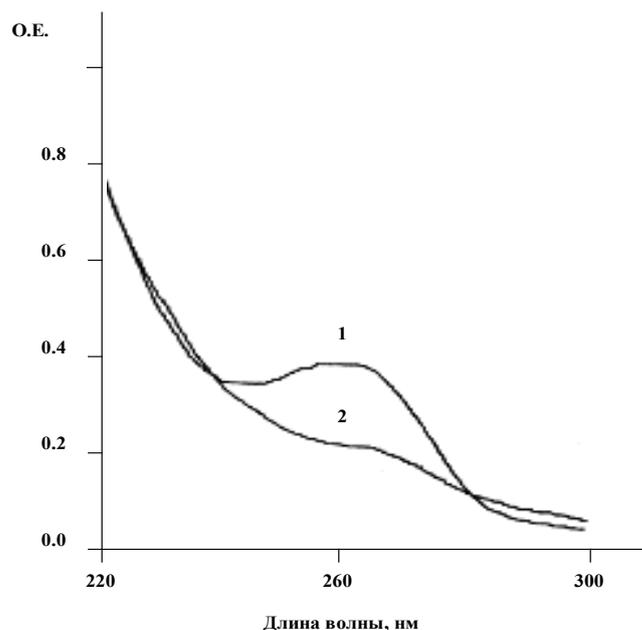


Рис. 1. УФ-спектры поглощения дегазированного раствора ДНК (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20°C):
1 – свежеприготовленный раствор; 2 – через 72 часа после приготовления раствора

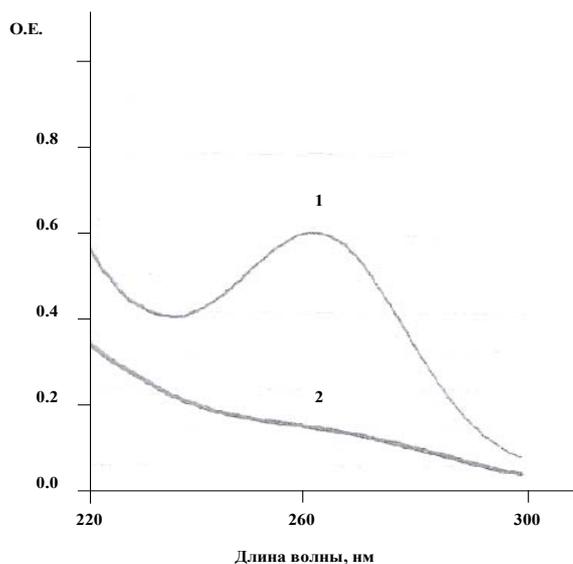


Рис. 2. УФ-спектры поглощения раствора ДНК (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 С), насыщенного водородом:
1 – свежеприготовленный раствор; 2 – через 72 часа после приготовления раствора

Появление восстановительных свойств у растворов, барботируемых водородом, обусловлено электронодонорными свойствами водорода по отношению к водным средам, а также – отрицательным потенциалом таких растворов [4].

Таким образом, полученные результаты (рис. 1,2) подтверждают мнение авторов [7], считающих, что величина A_{260} отражает

исключительно концентрацию ДНК, окисленной синглетным кислородом. Также, исходя из полученных результатов и предложенного объяснения природы кислород-зависимого гиперхромизма растворов ДНК [6-8], можно заключить, что УФ-спектры поглощения водных растворов, содержащих исключительно не окисленную ДНК, не имеют максимума на длине волны 260 нм. Поэ-

тому, следует согласиться с предложением определять концентрацию ДНК не по величине A_{260} ее растворов (как принято [1]), а колориметрически, по поглощению продуктов цветных реакций на фосфатные группы ДНК [10].

Заключение

В дегазированных рабочих растворах ДНК находится преимущественно в виде комплекса с супероксид-анионом, $\text{ДНК}^+\cdot\text{O}_2^-$, имеющего максимум на длине волны 260 нм [7,8]. Такое, окисленное, состояние ДНК не соответствует ее нативному состоянию, о чем свидетельствует сильный иммунный ответ на ДНК, модифицированную синглетным кислородом [6]. Поэтому, для возможности корректной экстраполяции свойств ДНК, проявляемых в экспериментах *in vitro*, на свойства нативной ДНК, исследования ДНК *in vitro* целесообразно проводить в дегазированных растворах, УФ-спектры поглощения которых не имеют пика с максимумом на длине волны 260 нм. (Учитывая состояние гипоксии, свойственное тканям опухолей [10], в таких же растворах целесообразно проводить исследования опухолевых ДНК.)

В то же время, исследования митохондриальной ДНК больных старческим деменцией, болезнями Паркинсона, Альцгеймера и другими заболеваниями людей преклонного возраста, которые связывают с окислительным повреждением митохондрий

альной ДНК и образованием ее комплекса с супероксид-анионом [11], целесообразно проводить в кислородсодержащих растворах, УФ-спектры поглощения которых имеют максимум на длине волны 260 нм.

Список литературы

1. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов: учебно-методическое пособие для вузов. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2008. – С. 14-15.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1987. – С. 163.
3. Красногорская Н.В. Электромагнитные поля в атмосфере Земли и их биологическое значение. Т.1. – М.: Наука, 1984. – С. 60-61.
4. Некрасов Б.В. Основы общей химии. Т. 1. – М.: Химия, 1974. – С. 207.
5. Пивоваренко Ю.В., Шабликін О.В., Васильев О.М. Природа взаємодій між катіогенними N-оксидфеназинами та ДНК // Медична хімія. – 2012. – № 3. – С. 20-24.
6. Хан Фозия, Хан Фарина, Сиддику А.А., Али Р. Повышение иммуногенности плазмидной ДНК под действием синглетного кислорода // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 8. – С. 1074-1082.
7. Doshi R., Day P.J.R., Tirelli N. Dissolved oxygen alteration of the spectrophotometric analysis and quantification of nucleic acid solutions // Biochemical Society Transactions. – 2009. – Vol. 37, № 2. – P. 466-470.
8. Doshi R., Day P.J.R., Carampin P. at all. // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – Vol. 396. – P. 2331-2339.
9. Kanvah S., Joseph J., Schuster G.B. at all. // Accounts of Chemical Research. – 2010. – Vol. 43, № 2. – P. 280-287.
10. Mergny J.-L., Li J., Lacroix L., Amrane S., Chaires J.B. // Nucleic Acids Research. – 2005. – Vol. 33, № 16. – P. 1-6.
11. Ozawa T. Oxidative Damage and Fragmentation of Mitochondrial DNA in Cellular Apoptosis // Bioscience Reports. – 1997. – Vol. 17, № 3. – P. 237-250.