

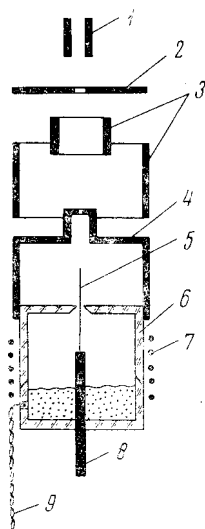
И. К. ЯНСОН, Л. Ф. СУХОДУБ

РЯД СТАБИЛЬНОСТИ ПАР АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(Представлено академиком И. М. Лифшицем 24 IV 1975)

В двойных спиральных дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК) аденин образует специфические водородные связи с тиминном или урацилом, а гуанин — с цитозином ⁽¹⁾. Эти специфические взаимодействия ответственны за перенос генетической информации нуклеиновыми кислотами. Теоретические ⁽²⁾ и экспериментальные работы ⁽³⁾, посвященные выяснению механизма этой специфичности, показы-

Рис. 1. Источник ионов. 1—4 — электронная оптика, формирующая ионный пучок, 5 — платиновая игла, 6 — кнудсеновская камера, заполненная смесью азотистых оснований, 7 — нагреватель, 8 — высоковольтный электрод, 9 — термопара медь — константан



вают, что она существует даже на уровне изолированных оснований, не включенных в структуру ДНК. При этом в теоретических работах рассматривается взаимодействие оснований в вакууме, а эксперименты проводятся в растворах с использованием косвенных методов регистрации.

В настоящей работе сообщается о результатах экспериментов, целью которых было прямое наблюдение образования комплементарных уотсон-криковских пар оснований в вакууме. С помощью метода полевой ионизации молекул и последующего масс-спектрометрического анализа состава молекулярного пучка зарегистрированы пары оснований различного состава и установлен ряд их относительной стабильности.

Источник ионов (рис. 1) представлял собой разборную кнудсеновскую камеру объемом $\sim 0,5$ см³, заполнявшуюся мелкокристаллическим порошком изучаемых веществ. Основания были метилированы по первому положению для пиримидинов: урацила (У), тимина (Т), цитозина (Ц), и девятому положению для пуринов: аденина (А) и гуанина (Г) (рис. 2), чтобы исключить возможность образования водородной связи с атомом азота, связанным ковалентно с сахарно-фосфатным остовом ДНК и РНК. У выхода из камеры испарения (6) молекулярный пучок проходил в сильном

электрическом поле, создаваемом платиновым острием (5) с радиусом закругления $\sim 10^{-5}$ см, на которое подавался потенциал +3 кв. Часть молекул притягивалась к острию и ионизировалась за счет туннельного перехода электрона в металл. Масс-спектры при полевой ионизации состоят лишь из нескольких пиков (4), которые в нашем случае соответствовали

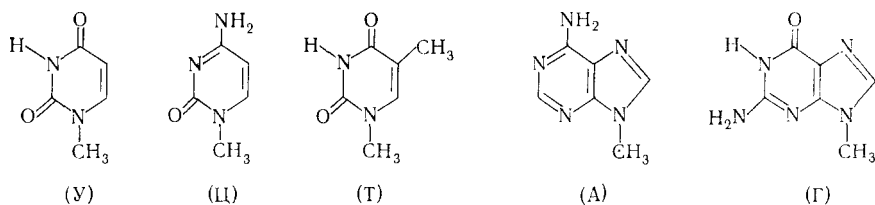


Рис. 2. Объекты исследования — метилированные основания нуклеиновых кислот

ионам одиночных молекул (мономерам) и их ассоциатам (димерам) (рис. 3) *.

Масс-спектры эквимольных смесей А и У или Т представлены на рис. 3 а, б. Они не зависели от того, представляла ли навеска механическую смесь обеих компонент или кристаллы комплементарных пар, полученные выпариванием водного раствора (5). Пороговая чувствительность детектора ионов составляла $\sim 5 \cdot 10^{-18}$ а. Пики димеров АУ или АТ и УУ

Таблица 1

Пара оснований	Мол. вес	Константа ассоциации $\cdot 10^7$	Т-ра, °С	Относительная константа ассоциации
АУ	275	47,4	60	20,7
УУ	252	2,3		
АТ	289	26,9	40	14
ТТ	280	1,9		
АУ	275	4000	40	5,7
УТ	266	700		
УУ	252	190		
ГЦ	290	15,7	110	67
ЦЦ	250	0,24		

или ТТ отчетливо наблюдались в интервале температур 28—60°. Парциальное давление А при этих температурах еще не достаточно для образования ассоциатов АА. Так как интенсивность пиков I пропорциональна парциальным давлениям компонент, то константы ассоциации K равны

$$K_{AT} = \frac{I_{AT}}{I_A I_T}; \quad K_{TT} = \frac{I_{TT}}{(I_T)^2} \quad \text{и т. д.} \quad (1)$$

Учитывая, что $I_T \gg I_A$, а $I_{AT} \approx I_{TT}$, получим $K_{AT} \gg K_{TT}$, как и следовало ожидать для комплементарных пар.

На рис. 3в приведены результаты для эквимольной смеси Г и Ц. Из-за малой интенсивности пика Г⁺ высота пика ГЦ⁺ меньше ЦЦ⁺, однако $K_{ГЦ} \gg K_{ЦЦ}$.

Асимметричная форма пика ЦЦ означает, что в данном случае спаривание происходит на заметном расстоянии от поверхности острия.

* Предварительные эксперименты, проведенные нами (7), показали, что метод ионизации электронным ударом непригоден для наблюдения ассоциатов из-за «жесткости».

В табл. 1 приведены константы ассоциации и температуры, при которых они были получены. Относительные значения констант, приведенные в последнем столбце, зависят только от температуры и хорошо воспроизводятся в различных экспериментах. Эти данные можно представить в виде

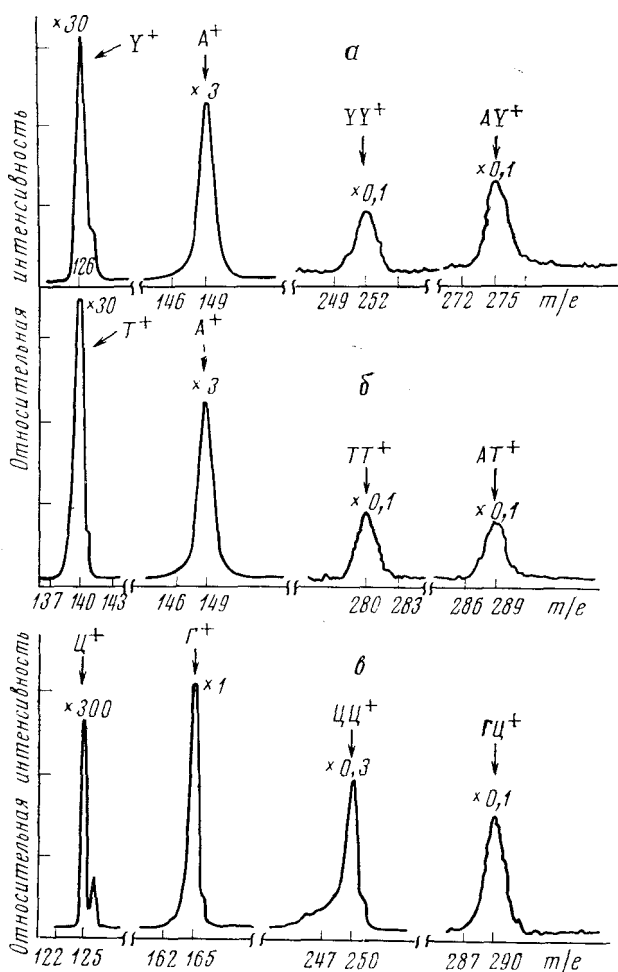


Рис. 3. Полевые масс-спектры оснований и их ассоциатов. а — смесь АУ, $t=60^\circ$; б — смесь АТ, $t=60^\circ$; в — смесь ГЦ, $t=110^\circ$. Соотношение компонент в навеске 1:1. Возле каждого пика указан соответствующий множитель шкалы

неравенств, отражающих относительную стабильность димеров,

$$K_{AT} \gg K_{TT}; \quad K_{AY} \gg K_{UY} > K_{TT}; \quad K_{ГЦ} \gg K_{ЦЦ}. \quad (2)$$

Кроме того, совместное испарение трехкомпонентной смеси А+Т+У позволило установить, что

$$K_{AY} \gg K_{YT} > K_{UY} \quad (t=40^\circ). \quad (3)$$

Таким образом, экспериментальный ряд стабильности пар оснований в вакууме имеет вид

$$ГЦ \gg ЦЦ \text{ и } АУ > АТ \gg УТ > УУ > ТТ. \quad (4)$$

Чтобы сравнить константы ассоциации пар оснований, содержащих с одной стороны Г и Ц, а с другой — А, Т и У, необходимо измерить их температурные зависимости, из которых можно определить также и энергии

связи пар ΔH . Предварительные измерения были проведены для пар АУ и УУ и дали значения $\Delta H = 15$ ккал-моль и 9 ккал/моль соответственно.

Представляется очевидным, что стабильность пар, состоящих из Г и Ц, существенно выше стабильности пар, содержащих А, Т и У. Этот вывод следует как из факта наблюдения пар ГЦ и ЦЦ при значительно более высокой температуре, чем А, Т и У-ассоциатов (табл. 1), так и из наших данных по теплотам сублимации отдельных компонент ⁽⁶⁾, которые можно представить в виде ряда стабильности ассоциатов из одинаковых оснований

$$ГГ \gg ЦЦ \gg АА > ТТ > УУ. \quad (5)$$

Сравнивая (5) и (4), видим, что прямые измерения взаимодействия оснований в вакууме вносят коррективы в расположение последних членов ряда (ТТ и УУ). Полученный нами ряд стабильности (4) совпадает с предсказанным в теоретической работе ⁽²⁾

$$ГЦ > ГГ > ЦЦ > УГ > ТГ > АЦ > АГ > АУ > АТ > УУ > АА > ТТ > УЦ > ТЦ. \quad (6)$$

Этот ряд не содержит пары УТ, относительное положение которой мы определили в опыте. Дальнейшие эксперименты должны проверить правильность относительного расположения всех членов ряда (6). Предложенная в настоящей работе методика позволяет исследовать степень ассоциации между любыми азотистыми основаниями и их производными.

Мы глубоко благодарны Б. И. Веркину за внимание к работе и группе сотрудников Института физической химии АН УССР, руководимой Э. Н. Королем, оказавшей существенную помощь во внедрении метода полевой ионизации в нашей лаборатории.

Физико-технический институт
низких температур
Академии наук УССР
Харьков

Поступило
15 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. D. Watson, F. H. G. Crick, Nature, v. 171, 737 (1953). ² V. I. Danilov, N. V. Zheltovsky, Z. G. Kudritskaya, Studia biophysica, v. 43 (3), 201 (1974). ³ М. Эйгем, Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул, М., «Мир», 1973, стр. 108. ⁴ В. А. Покровский, Автореф. канд. дисс., М., ИХФ АН СССР, 1974. ⁵ K. Hoogsteen, Acta crystallogr., v. 12, 822 (1959); v. 16, 907 (1963). ⁶ И. К. Янсон, Б. И. Веркин и др., Studia biophysica, v. 46 (1), 29 (1974). ⁷ Л. Ф. Суходуб, И. К. Янсон, Тез. докл. на II Всесоюз. конфер. по спектроскопии биополимеров, Харьков, 1974, стр. 97.