

БИОФИЗИКА

УДК 577.113.6

Ս. Օ. Վարդևանյան, Ա. Ս. Անտոնյան, Մ. Ա. Շագինյան,  
Լ. Ա. Ամբարձումյան

Исследование связывания метиленового синего с ДНК  
спектроскопическими методами

(Представлено чл.-кор. НАН РА Л.А. Тавадяном 29/XI 2012)

**Ключевые слова:** ДНК тимуса теленка, метиленовый синий, спо-  
собы связывания, полуинтеркаляция.

Исследования связывания низкомолекулярных веществ с ДНК актуальны, поскольку позволяют выяснить различные вопросы, связанные с функционированием ДНК в комплексе с различными биологически активными молекулами. Это также важно и с точки зрения синтеза новых лекарственных препаратов, связывающихся с ДНК и влияющих на ее функционирование [1, 2]. Существует три способа взаимодействия нековалентно связывающихся лигандов с ДНК – электростатическое, желобковое и интеркаляционное [1, 3]. Электростатическое связывание между катионами и отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК неспецифично и обычно происходит вдоль внешней стороны двойной спирали ДНК. Связывание в желобке в основном включает прямое взаимодействие с образованием водородных связей или ван-дер-Ваальсовыми контактами с основаниями в большом или малом желобке ДНК. Интеркаляция же происходит за счет образования стекинг контактов с парами оснований. Очевидно, что в последних двух случаях молекулы лиганда связываются в одном из желобков ДНК, в то время как электростатическое связывание может происходить вне желобка.

Среди многочисленных нековалентно связывающихся лигандов определенный интерес представляет метиленовый синий (МС), (схема 1), являющийся фенитиазиниловым красителем, который обладает фотосенсибилизирующим свойством и применяется в фотодинамической терапии (ФДТ) [4, 5]. Полагается, что этот лиганд, благодаря планарной структуре, идентичной акридиновым красителям, связывается с ДНК интеркаляци-

онным механизмом, однако достоверность этого факта до конца еще не подтверждена [6-11]. Спектроскопические и электрохимические исследования комплексов  $\beta$ -циклодекстрин производных МС с ДНК позволили выявить, что возможно также электростатическое связывание [8,9]. Этот факт обосновывается тем, что при низких ионных силах раствора МС должен интеркалировать в ДНК, в то время как с увеличением концентрации соли МС одновременно с интеркаляцией также внешне связывается с ДНК [10,11].

Одной из особенностей МС является то, что этот лиганд поглощает свет в длинноволновой области ( $\lambda=664$  нм), при этом интенсивность флуоресценции регистрируется в этой же области (от 600 до 1000 нм), что можно объяснить тем, что энергия возбуждения при переходе электронов в невозбужденное стационарное состояние в основном излучается в виде света, с небольшими потерями.

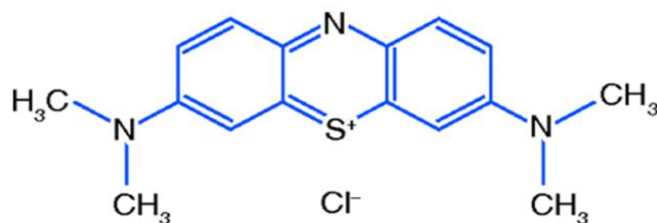


Схема 1. Молекулярная структура МС.

В настоящей работе подробно исследована характеристика взаимодействия метиленового синего (МС) с дезоксирибонуклеиновой кислотой тимуса телят (ДНК). Обсуждаются также механизмы взаимодействия МС с ДНК.

**Материалы и методы. Реагенты.** В работе были использованы ДНК тимуса телят, "Sigma" (США), МС, "Aldrich" (США). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации использованных препаратов определяли абсорбционным методом, используя следующие коэффициенты экстинкции: ДНК тимуса телят –  $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , МС –  $\epsilon_{668}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Исследования проводились при ионной силе раствора  $\mu=0.02 \text{ M Na}^+$  и температуре  $25^\circ\text{C}$ .

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометрах PVE Unicam-SP8-100 (Англия) и UV-VIS (Spectrophotometer Specord) 50 Analytik Jena (Германия), спектры флуоресценции регистрировались на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Австралия). Для спектрофотометрических измерений использовались кварцевые кюветы объемом 3 мл, длиной оптического пути 1 см.

Титрование растворов исследуемых образцов проводилось микропипеткой объемом 10  $\mu\text{l}$  фирмы “Hamilton” (США).

Для получения спектров поглощения концентрация МС в растворе оставалась постоянной, а концентрация ДНК возрастала по ходу титрования. Спектры комплексов МС с ДНК и чистого лиганда измерялись в диапазоне изменения длин волн  $220 \leq \lambda \leq 750$  нм. Максимум поглощения чистого МС соответствует длинам волны 270 и 664 нм. По ходу спектрофотометрического титрования с увеличением концентрации ДНК максимум поглощения раствора МС уменьшается при  $\lambda=664$  нм. С некоторого значения  $C_{\text{ф}}/C_0 \approx 6$  наблюдаются также сдвиг в сторону длинных волн и изобестическая точка при 690 нм, где  $C_{\text{ф}}$  – концентрация фосфатных групп ДНК,  $C_0$  – полная концентрация МС.

Растворы, использованные для измерений интенсивности флуоресценции, были приготовлены так же, как для измерения спектров поглощения. Спектры флуоресценции МС были зарегистрированы в области длин волн 300-750 нм при длине волны возбуждения 290 нм.

Из спектров поглощения и флуоресценции была построена изотерма адсорбции, как описано в работе [12].

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 приведены спектры флуоресценции чистого МС (кривая 1) и его комплексов с ДНК (кривые 2-12). Спектры флуоресценции получены в интервале изменения длины волны  $300 \leq \lambda \leq 750$  нм при возбуждении длиной волны 290 нм. Длина волны возбуждения была выбрана 290 нм, поскольку на спектрах поглощения проявляются два пика поглощения – при 270 и 664 нм. При аналогичных исследованиях обычно возбуждение проводится при длинах волн, наиболее близких к самому длинноволновому пику испускания (см. [12]). Однако при возбуждении при 290 нм на спектре чистого МС, наряду с пиком испускания при 682 нм, появляется еще один пик испускания при 583 нм. Обычно спектры флуоресценции многоатомных органических соединений однополосные, если нет процесса эксимеризации [13]. При этом пики испусканий, появляющиеся при эксимеризации, сдвинуты в сторону более длинных волн по сравнению с основным пиком.

При выбранных нами концентрациях МС ( $\sim 10^{-6}$  моль/л) димеризацией или эксимеризацией можно пренебречь, следовательно, наличие двух пиков эмиссии указывает на особенности спектра флуоресценции этого соединения. По мере увеличения концентрации ДНК в растворе МС наблюдается тушение флуоресценции при 682 нм. В работе [12] было показано, что тушение флуоресценции МС при комплексообразовании с ДНК обусловлено интеркаляцией молекул лиганда в двухцепочечную структуру макромолекулы, вследствие которой, по всей вероятности, имеет место перенос энергии возбуждения от молекул МС к ДНК. Уменьшение максимумов флуоресценции наблюдается также при 583 нм при низких концентрациях ДНК ( $r \geq 0.2$ , где  $r = [\text{МС}]/[\text{ДНК}]$ ).

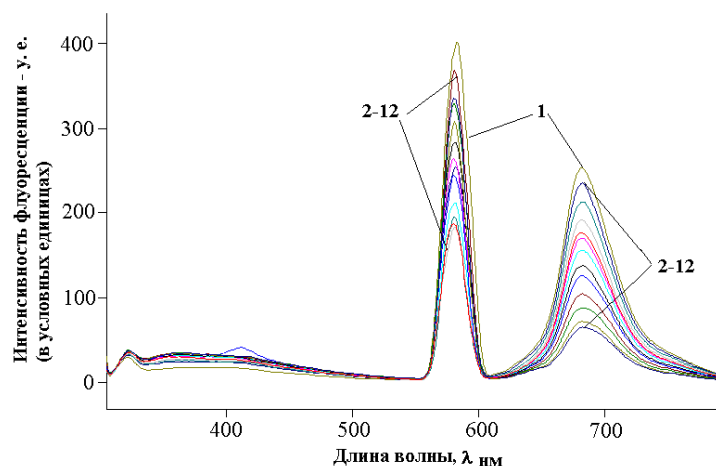


Рис. 1. Спектры флуоресценции чистого МС (1) и МС-ДНК комплексов (2-12) в водном растворе. Концентрация МС составляла  $1.6 \cdot 10^{-6}$  моль/л, концентрация ДНК возрастала от 0 до значений, соответствующих соотношению ДНК/МС=15 (одна молекула лиганда на пару оснований).

Однако при возрастании концентрации ДНК ( $r < 0.2$ ) интенсивность флуоресценции при 583 нм начинает монотонно увеличиваться (рис. 1, кривые 2-12).

Таким образом, на основании полученных результатов мы полагаем, что по мере возрастания концентрации ДНК в растворе молекулы МС начинают связываться с ней в основном электростатическим способом, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции как при 682 нм, так и при 583 нм. По мере возрастания концентрации ДНК молекулы лиганда начинают связываться с ней вторым, скорее всего интеркаляционным механизмом, что приводит к уменьшению при относительно длинноволновой (682 нм) и увеличению интенсивности флуоресценции более коротковолновой (583 нм) области.

На рис. 2 приведены спектры поглощения МС с ДНК. Как видно из рисунка, на спектрах поглощения МС в видимой области света имеет место максимум поглощения при 668 нм с плечом при 610 нм (кривая 1). В присутствии увеличивающегося количества ДНК поглощение МС уменьшается (гипохромный эффект), при этом на спектрах поглощения обнаруживается небольшой длинноволновый сдвиг. Изменения поглощения и  $\lambda_{\text{max}}$  МС зависят от значений концентрации ДНК. При низких значениях  $r$  ( $r \geq 0.2$ ) в основном проявляется гипохромный эффект, в то время как сдвиг  $\lambda_{\text{max}}$  практически не обнаруживается. При увеличении концентрации ДНК ( $r < 0.2$ ) наряду с гипохромным эффектом проявляется также длинноволновый сдвиг (почти 3 нм).

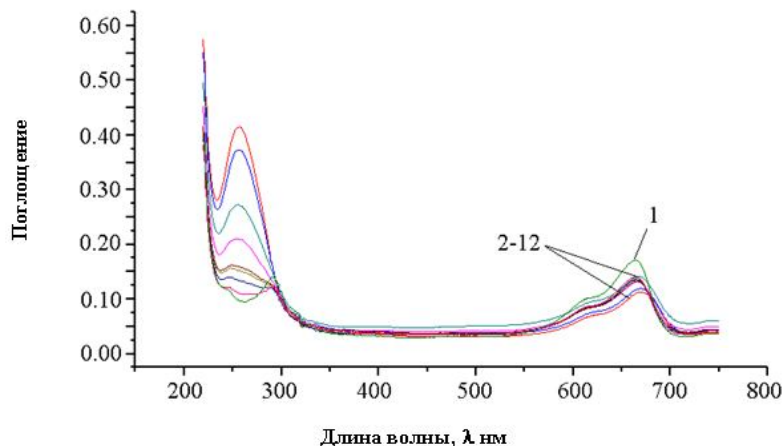


Рис. 2. Спектры поглощения чистого МС и комплексов МС-ДНК в водном растворе при комнатной температуре. Кривая 1 соответствует спектру поглощения чистого МС, кривые 2-12 – спектрам поглощений комплексов.

Известно, что красный сдвиг и гипохромный эффект обычно наблюдаются на спектрах поглощения низкомолекулярных веществ, если они интеркалируют в ДНК. Из рис. 2 видно, что взаимодействие МС с увеличивающейся концентрацией ДНК при относительно больших значениях  $r$  приводит к появлению гипохромного эффекта, но без заметного сдвига  $\lambda_{\text{max}}$ , что указывает на то, что в этих условиях интеркаляция практически отсутствует. В работах [14-17] показано, что спектры поглощения при полной интеркаляции лигандов в ДНК, имеющих систему ароматических колец, в частности бромистого этидия (БЭ), актиномицина Д (АМД), профлавина, митоксантрона и др., сдвигаются в сторону длинных волн по сравнению со спектрами чистых лигандов примерно на 40-50 нм. С другой стороны, в работах [14,17] показано, что в случае неполной интеркаляции сдвиг в длинноволновую область спектров поглощения комплексов БЭ с одноцепочечной (оц) ДНК намного меньше, чем при полной интеркаляции. Исходя из этого мы полагаем, что в данном случае не имеет места полная интеркаляция молекул МС в двухцепочечную структуру ДНК.

Из анализа спектров флуоресценции и поглощения рассчитаны координаты Скетчарда [18] и построена соответствующая кривая связывания, приведенная на рис. 3. Необходимо отметить, что экспериментальные точки, полученные из анализа флуориметрических и абсорбционных данных, совпадали друг с другом, поэтому приводится обобщенная кривая.

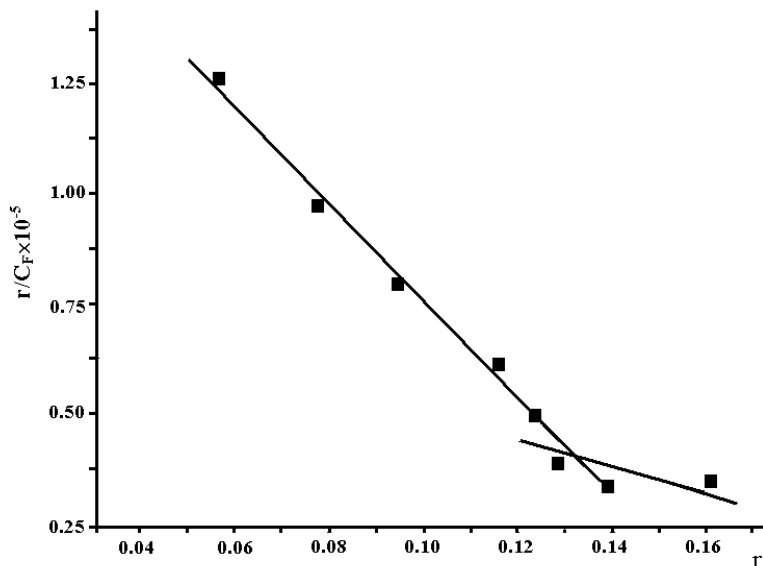


Рис. 3. Кривая связывания МС с ДНК в координатах Скетчарда.

Как видно из приведенного рисунка, кривая связывания во всей области изменения  $r$  нелинейна и состоит из двух прямолинейных участков, соответствующих двум способам взаимодействия. Один из них сильный и характеризуется константой связывания лиганда с ДНК  $\sim 6.5 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$  и числом оснований, соответствующих одному месту связывания –  $\sim 4$ . Второй более слабый, с константой связывания  $\sim 1.5 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$  и числом оснований, соответствующих одному месту связывания –  $\sim 2$ . Ранее были проведены аналогичные исследования по взаимодействию БЭ с ДНК [14], где показано, что изотермы адсорбции этого лиганда на дц-ДНК, полученные из анализа флуориметрических и абсорбционных данных, расходятся, при этом с помощью флуоресцентного метода был выявлен только интеркаляционный способ связывания БЭ с дц-ДНК (изотерма адсорбции прямолинейна в этом случае), в то время как с помощью абсорбционного метода выявлялись по крайней мере два способа (кривая связывания нелинейная и состоит из двух участков) [14]. При этом сравнительный анализ этих кривых выявил еще один способ связывания со значениями  $K \approx 3 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$  и  $n \approx 6$ . Аналогичные результаты были получены при взаимодействии БЭ с одноцепочечной (оц) ДНК, в случае которой полная интеркаляция невозможна (см. [14]). В работах [19, 20] показано, что и БЭ, и АМД могут связываться с ДНК полуинтеркаляционным способом, как это показано на схеме 2. В этих работах показано также, что значения параметров связывания, соответствующих полуинтеркаляции этих лигандов в ДНК, составляли  $K_{\text{ин}} \approx 10^5 \text{M}^{-1}$  и  $n_{\text{ин}} \approx 4-6$ .

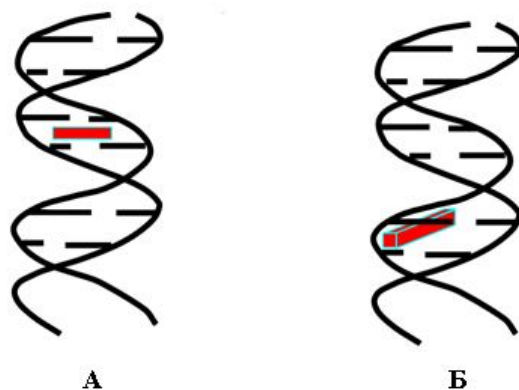


Схема 2. Интеркаляция (А) и полуинтеркаляция (Б) молекулы лиганда в ДНК

Таким образом, сравнение экспериментальных данных, полученных для комплексов ДНК-МС, с аналогичными данными в вышеуказанных работах позволяют заключить, что МС с ДНК скорее всего взаимодействует полуинтеркаляционным способом. Более того, эти данные также могут быть отражением того факта, что МС, как и некоторые лиганды, например БЭ, актиномицин Д (АКД), Hoechst 33258 и др., проявляет мультимодальность при взаимодействии с ДНК [14-17, 19, 21, 22].

**Заключение.** Исследованы особенности взаимодействия МС с ДНК методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий. Полученные результаты выявили, что способы связывания МС с ДНК зависят от молярного соотношения  $r$ . При больших значениях  $r$  положительно заряженные молекулы МС в основном связываются с фосфатными группами ДНК электростатическим способом, вследствие чего интенсивность флуоресценции уменьшается, а на спектрах поглощения наблюдается гипохромный эффект. При низких значениях  $r$  начинает проявляться второй способ, соответствующей полуинтеркаляционному, при котором молекулы МС вклиниваются в пространство между двумя соседствующими основаниями одной из нитей ДНК.

Ереванский государственный университет

**П. О. Вардеванян, А. П. Антонян, М. А. Шагинян,  
Л. А. Амбарцумян**

**Исследование связывания метиленового синего с ДНК  
спектроскопическими методами**

Исследовано взаимодействие метиленового синего (МС) с ДНК тимуса теленка (ДНК). Установлено, что способы связывания этого лиганда с ДНК зависят от молярного соотношения  $r$  ( $r = [\text{лиганд}]/[\text{ДНК}]$ ). При больших значениях  $r \geq 0.25$  и в присутствии увеличивающегося количества ДНК наблюдается значительный гипохромный эффект на спектрах поглощения МС, однако сдвиг  $\lambda_{\text{max}}$  при этом не

происходит. В этих условиях флуоресценция МС значительно тушится ДНК, что указывает на то, что катионы МС связаны с фосфатными группами ДНК электростатическим взаимодействием, образуя стопки на поверхности спирали ДНК. При уменьшении  $r$  ( $r < 0.2$ ) кроме значительного тушения флуоресценции МС основаниями ДНК, наблюдается красный сдвиг на спектрах поглощения, что означает, что предпочтительным способом связывания является полуинтеркаляция – молекулы МС встраиваются в пространство между двумя соседствующими основаниями в одной из нитей ДНК.

**Պ. Հ. Վարդևանյան, Ա. Պ. Անտոնյան, Մ. Ա. Շահինյան,  
Լ. Ա. Համբարձումյան**

**ԴՆԹ-ի հետ մեթիլեն կապույտի կապման ուսումնասիրությունը  
սպեկտրոսկոպիկ մեթոդներով**

Ուսումնասիրվել է հորթի թիմուսի ԴՆԹ-ի հետ (հթ-ԴՆԹ) մեթիլեն կապույտի (ՄԿ) փոխազդեցությունը: Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ ԴՆԹ-ի հետ այս լիգանդի կապման եղանակները կախված են  $r$  մոլային հարաբերությունից ( $r = [\text{լիգանդ}]/[\text{ԴՆԹ}]$ ):  $r \geq 0.25$  արժեքների դեպքում և ԴՆԹ-ի քանակության աճի պայմաններում, ՄԿ-ի կլանման սպեկտրներում դիտվում է էական հիպոքրոմային էֆեկտ, ընդ որում,  $\lambda_{\text{max}}$ -ի տեղաշարժ այս դեպքում տեղի չի ունենում: Այս պայմաններում ԴՆԹ-ն էականորեն մարում է ՄԿ-ի ֆլյուորեսցենցիան, ինչը վկայում է այն մասին, որ ՄԿ-ի կատիոնները կապված են ԴՆԹ-ի ֆոսֆատային խմբերի հետ էլեկտրաստատիկ փոխազդեցության միջոցով և ԴՆԹ-ի պարույրի մակերեսին առաջացնում են սյունակներ:  $r$ -ի նվազման դեպքում ( $r < 0.2$ ), բացի ԴՆԹ-ի հիմքերով ՄԿ-ի ֆլյուորեսցենցիայի էական մարման, կլանման սպեկտրների վրա դիտվում է կարմիր տեղաշարժ, ինչը նշանակում է, որ կապման նախընտրելի եղանակը դառնում է կիսաինտերկալյացիան: ՄԿ-ի մոլեկուլները ներդրվում են ԴՆԹ-ի շղթաներից մեկի երկու հարևան հիմքերի միջև եղած տարածության մեջ:

**P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Shahinyan,  
L. A. Hambardzumyan**

**Investigation of Binding of Methylene Blue to DNA  
by Spectroscopic Methods**

The interaction of methylene blue (MB) with calf thymus DNA (ct-DNA) has been investigated. The obtained data indicate that binding modes of this ligand with DNA depend on molar ratio  $r$  ( $r = [\text{ligand}]/[\text{DNA}]$ ). The significant hypochromic effect is observed on absorption spectra of MB at high values of  $r$   $r \geq 0.25$  and at presence of increasing amount of DNA, however, the shift of  $\lambda_{\text{max}}$  does not occur in this case. At these conditions the fluorescence of MB is significantly quenched by DNA, which indicates that cations of MB are bound to phosphate groups of DNA by electrostatic interactions, forming stacks on DNA helix surface. With decreasing of  $r$  ( $r < 0.2$ ), besides significant quenching of MB fluorescence by DNA bases red shift is observed on absorption spectra, which means that the preferable binding mode becomes semi-intercalation – molecules of MB are embedded in space between two neighboring bases of one strand of DNA.



## Литература

1. Вардеванян П.О., Антонян А.П. - Биол. журн. Армении. 2010. Т. 62. N 3(62). С. 50-58.
2. Lane A.N., Jenkins T.C. - Rev. Biophys. 2000. V. 33. N 3. P. 255-306.
3. Nafisi Sh., Saboury A.A., Keramat N., Neault J.F., Tajmir-Riahi H.A. - Journal of Molecular Structure. 2007. V. 827. P. 35-43.
4. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. - J. Photochem. Photobiol. B. 2003. V. 71. p. 87-98.
5. Orth K., Beck G., Genze F., Ruck A. - J. Photochem. Photobiol. B. 2000. V. 57. P. 186-192.
6. Rohs R., Sklenar H., Lavery R., Roder B. - J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. P. 2860-2866.
7. Rohs R., Sklenar H. - J. Biomol. Struct. & Dyn. 2004. V. 21. N 5. P. 699-711.
8. Zhao G.C., Zhu J.J., Chen H.Y. - Spectrochim. Acta A. 1999. V.55. P.1109-17.
9. Zhao G.C., Zhu J.J., Zhang J.J., Chen H.Y. - Anal. Chim. Acta. 1999. V. 394. P. 337-344.
10. Hossain M., Giri P., Kumar G.S. - DNA and Cell Biology. 2008. V. 27 N 2. P. 81-90.
11. Zhu L., Zhao R., Wang K., Xiang H., Shang Zh., Sun W. – Sensors. 2008. V. 8. P. 5649-5660.
12. Changlun T., Zhou H., Jianmin W. - J. Fluoresc. 2010. V. 20. P. 261-267.
13. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М. Мир. 1986. 496 с.
14. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. - Experimental and Molecular Medicine 2003 V. 35. N 6. P. 527-533.
15. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суровая А.Н. - Мол. Биология. 1998. Т. 32. С. 855-862.
16. Бабаян Ю.С., Казарян Р.С., Согомонян Л.Р., Аветисян М.Г., Снегрян А.Е., Гарибян Д.В. – Биофизика. 1998. Т. 43. Вып. 3. С. 422-426.
17. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. - Мол. Биология. 2000. Т. 34. С. 310-315.
18. Кантор Ч., Шиммель П. - Биофизическая химия. Т. 3. 1985. М.Мир. 534 с.
19. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. - Мол. Биология. 1997. Т. 31. N 2. С. 263-273.
20. Wadkins R.M., Jares-Erijman A.E., Klement R., Rudiger A., Jovin T.M. - J. Mol. Biol. 1996. V. 262. P. 53-68.
21. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Miradyan A.M., Karapetyan A.T. - J. Biomol. Struct. Dyn. 2008. V. 25. N 6. P. 641-646.
22. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. - Биофизика. 2003. Т. 48. Вып. 4. С. 644-647.