

УДК 539.171.4:532.74+547.979.733+577.323.23

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ВОДНО-СОЛЕВЫХ РАСТВОРОВ ДНК
С СУЛЬФИРОВАННЫМ ДИФТАЛОЦИАНИНОМ СКАНДИЯ**© 2007 Ю.В. Кульвелис^{1*}, В.Т. Лебедев¹, Д. Торок², А.Б. Мельников³¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, Гатчина²Институт физики твердого тела и оптики, Будапешт, Венгрия³Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет

Статья поступила 12 марта 2007 г.

Методами малоуглового рассеяния нейтронов, динамического светорассеяния и атомной силовой микроскопии изучено взаимодействие сульфированного дифталоцианина скандия $\text{ScPc}_2(\text{SO}_3)_4(\text{NH}_4)_4$ в водно-солевых растворах (NH_4Cl) с ДНК. Полученные данные, свидетельствующие о компактизации молекул ДНК, согласуются с результатами, полученными ранее методами вискозиметрии и спектрофотометрии.

Ключевые слова: дифталоцианины, ДНК, рассеяние нейтронов.**ВВЕДЕНИЕ**

Фталоцианин является синтетическим аналогом порфиринов [1]. Он может образовывать комплексные соединения — металлофталоцианины, реагируя с солями металлов. Впервые фталоцианины легких металлов были синтезированы в Англии в 1930-е годы. Они оказались очень радиационно прочными и термически устойчивыми соединениями [2—5]. В конце 1950-х годов в ЛИЯФ АН СССР началась работа по синтезу и исследованию фталоцианинов тяжелых металлов [6—9]. Фталоцианины ряда металлов (Co, Ni, Cu и др.) — комплексы с высочайшей устойчивостью, в растворах концентрированной H_2SO_4 они не изменяются месяцами и даже годами, тогда как почти все комплексы с другими лигандами в этих условиях мгновенно диссоциируют на ион металла и протонированный лиганд. Фталоцианин и его металлокомплексы нерастворимы в воде и органических растворителях, чрезвычайно устойчивы к щелочам, кислотам и свету, обладают окрасками спектральной чистоты и являются отличными пигментами в полиграфической промышленности [10].

В 1960-х гг. П.Н. Москалев с соавторами впервые синтезировал и начал исследования дифталоцианинов редкоземельных элементов (РЗЭ). Это соединения сэндвичевого типа, в которых ион металла-комплексобразователя расположен между двумя молекулами фталоцианинов [6, 11]. Впервые дифталоцианины металла были получены Линстедом для олова [3]. Оказалось, что дифталоцианины — это самые прочные из известных комплексных соединений РЗЭ. Они не разрушаются в концентрированной H_2SO_4 , выдерживают нагревание до 600 °С, при этом обладают рядом интересных свойств. Под действием электрических сигналов малой мощности они обратимо меняют окраску на синюю, зеленую, красную, фиолетовую (в зависимости от напряжения и полярности электрического сигнала), реагируют на наличие в воздухе паров вредных веществ — аммиака, оксидов азота, ацетона, бензина и др., откликаются на механические воздействия (электронный спектр и электрическое сопротивление).

* E-mail: kulvelis@pnpi.spb.ru

Особый интерес представляют водорастворимые дифталоцианины металлов. Растворимые в воде дифталоцианины можно получить в результате некоторых модификаций, в частности, сульфирования [12]. Сульфированные дифталоцианины РЗЭ являются отличными красителями.

Последнее время широко исследуют взаимодействие водорастворимых катионных порфиринов с ДНК. Установлено, что природа комплексов катионный порфирин—ДНК (интеркаляция порфирина или внешнее связывание) зависит от состава и последовательности нуклеотидов в двойной спирали ДНК, от строения и свойств порфирина и от соотношения концентрации порфирина и пар оснований ДНК [13]. Однако работ по исследованию взаимодействия анионных порфиринов с ДНК не известно. Отсутствие до недавнего времени интереса к анионным порфиринам было обусловлено тем, что молекула ДНК в растворе обладает отрицательным зарядом и не должна иметь склонности образовывать комплексы с анионами.

Порфирины и фталоцианины с боковыми сульфогруппами являются анионами в водных растворах. Сульфированные дифталоцианины металлов имеют заряд 4– за счет четырех групп SO_3^- . Ранее были обнаружены нетривиальные факты, свидетельствующие об адсорбции $\text{MPC}_2(\text{SO}_3)_4$ -анионов на некоторых отрицательно заряженных поверхностях модельных бислойных липидных мембран, монослоев искусственного липида глицеролмоноолеата [14] и сульфированных полистирольных латексов (также обладающих отрицательным зарядом за счет сульфогрупп, как и молекула ДНК) [15]. В связи с этим представляет интерес исследование растворов ДНК с анионными порфиринами и фталоцианинами.

Кроме того, сульфированные дифталоцианины металлов обладают ярко выраженной противовирусной активностью (в отношении вируса гриппа, саркомы Рауса). Токсичность этих соединений ниже, чем у ремантадина [16]. Наиболее высокие значения коэффициента защиты получены при испытании соединений скандия и лютеция [12, 16, 17], когда их добавляли в питательный раствор, извне омывающий клетки культуры. Изменение их функционирования, из общих соображений, может быть связано с взаимодействием исследуемых дифталоцианинов с внешней стороны клеточных мембран, а в случае проникновения внутрь — с мембранами внутриклеточных органелл и компонентами внутриклеточной протоплазмы, в состав которой входят белки и нуклеиновые кислоты.

Предметом настоящей работы является исследование взаимодействия сульфированного дифталоцианина скандия с ДНК. Предварительные результаты [18—21] свидетельствуют о взаимодействии ДНК с $\text{ScPc}_2(\text{SO}_3)_4^{4-}$ и $\text{LuPc}_2(\text{SO}_3)_4^{4-}$ и компактизации молекул ДНК в водно-солевых растворах при добавлении указанных красителей.

ОБРАЗЦЫ И МЕТОДЫ

Использовали ДНК из селезенки крупного рогатого скота с молекулярной массой 13 МДа, определенной ранее методом вискозиметрии. Сульфированный дифталоцианин скандия (краситель) был синтезирован П.Н. Москалевым [22] в виде соли аммония $\text{ScPc}_2(\text{SO}_3)_4(\text{NH}_4)_4$. Методами малоуглового нейтронного рассеяния, динамического рассеяния света и атомной силовой микроскопии исследовали растворы ДНК в D_2O с добавлением соли (1 мМ NH_4Cl) при отсутствии или в присутствии красителя.

Малоугловое рассеяние нейтронов исследовали в Институте физики твердого тела и оптики АН Венгрии (Будапешт) на установке Yellow Submarine [23].

Для динамического рассеяния света использовали лазер с длиной волны $\lambda_0 = 6238 \text{ \AA}$ и мощностью $P_{\lambda_0} = 25 \text{ мВт}$. Обработку данных (определение времени релаксации τ) проводили с помощью программы Dynals.

Опыты по атомной силовой микроскопии сухих образцов ДНК (капель растворов, высушенных на подложке — стекле или слюде, приготовленных в соответствии с [24]) были выполнены на атомном силовом микроскопе Olympus IX71.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом малоуглового рассеяния нейтронов исследовали растворы ДНК в тяжелой воде ($C_{\text{ДНК}} = 0,32$ г/дл) и ДНК + краситель ($C_{\text{ДНК}} = 0,32$ г/дл = $4,85 \times 10^{-3}$ М, $C_{\text{КР}} = 0,13$ г/дл = $9,08 \times 10^{-4}$ М) в диапазоне температур $T = 20\text{—}40$ °С и переданных импульсов $q = 0,01\text{—}0,3$ Å⁻¹. Значения обратных импульсов $2\pi/q = 20\text{—}600$ Å характеризуют пространственный масштаб — от поперечного размера нити ДНК до размеров порядка длины ее сегмента. При молекулярной массе ДНК, равной 13 Мда, ее контурная длина ~6,7 мкм, что составляет $N \sim 65$ сегментов Куна с характерной длиной $L \sim 1000$ Å [25]. Оценивая радиус инерции ДНК $R_{g\text{ДНК}} = (NL^2/6)^{1/2} \sim 3300$ Å, видим, что в данных опытах возможно наблюдение только фрагментов ДНК (сегментов).

Анализ данных о рассеянии нейтронов свидетельствует об изменении конформации ДНК при добавлении в раствор $\text{ScPc}_2(\text{SO}_3)_4(\text{NH}_4)_4$. На нижнем крае диапазона импульсов ($q < 0,1$ Å⁻¹, рис. 1, а) интенсивность рассеяния $I(q)$ как функция импульса описана функцией Гинье

$$I(q) = I_0 e^{-\frac{(qR_g)^2}{3}}, \quad (1)$$

где $I_0 = I_{q \rightarrow 0}$ пропорциональна концентрации полимера в растворе и массе рассеивающих объектов (сегментов), а R_g — радиус инерции этих частиц [26]. Использование этого уравнения дает радиус инерции $R_{g(\text{ком})} = 144 \pm 6$ Å для комплекса ДНК + краситель, что на 20 % меньше, чем $R_{g(\text{ДНК})} = 173 \pm 8$ Å для ДНК. Размеры сегментов $L_{\text{ком}} = \sqrt{12} R_{g(\text{ком})} \approx 500$ Å для комплекса и $L_{\text{ДНК}} = \sqrt{12} R_{g(\text{ДНК})} \approx 600$ Å для ДНК.

На верхнем крае q -диапазона ($q > 0,1$ Å⁻¹, см. рис. 1, б) распределение интенсивности подчиняется уравнению

$$I(q) = \frac{A}{q} e^{-\frac{(qr_G)^2}{2}} \quad (2)$$

для тонких стержней, где фактор A/q характеризует рассеяние в пределе тонкого стержня, а экспонента учитывает поперечный размер, связанный с радиусом инерции сечения стержня r_G . У однородного цилиндра радиус $r = \sqrt{2}r_G$. Согласно расчету по ур. (2), эффективный диаметр ДНК при взаимодействии с красителем увеличивается примерно в 2 раза: для свободной ДНК $r_{G(\text{ДНК})} = 7,0 \pm 0,9$ Å в широкой области импульсов; у растворов ДНК + краситель приближение

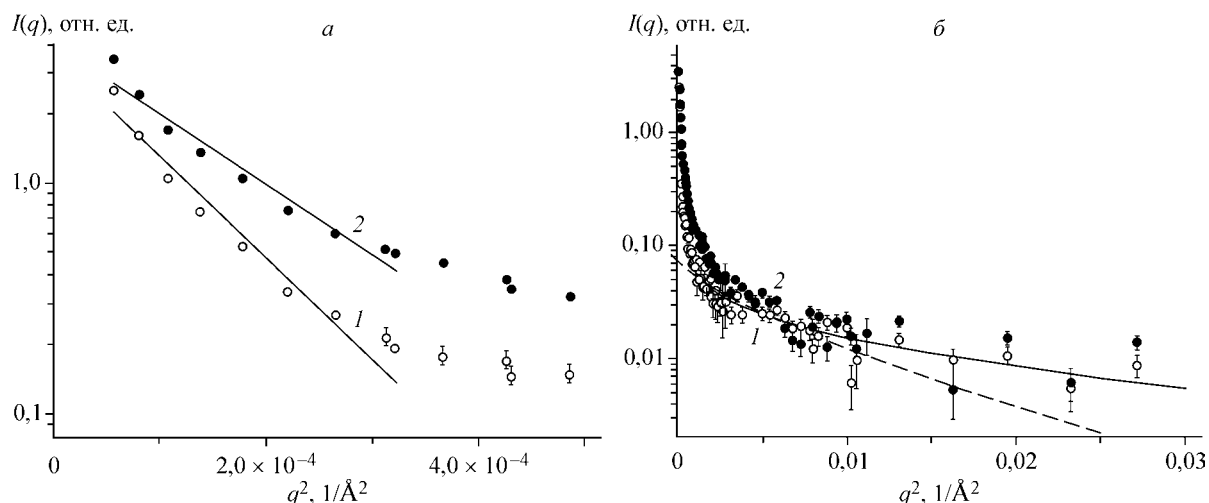


Рис. 1. Интенсивность нейтронного рассеяния водных D₂O растворов ДНК (1) и ДНК + $\text{ScPc}_2(\text{SO}_3)_4(\text{NH}_4)_4$ (2) в зависимости от переданного импульса q : а — область малых q (линии — расчет по ур. (1)), б — область больших q (линии — расчет по ур. (2))

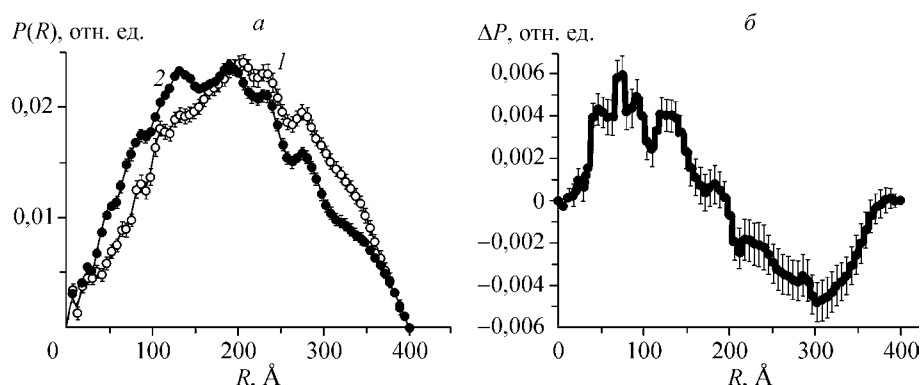


Рис. 2. Зависимость корреляционных функций для растворов ДНК (1) и ДНК + ScPc₂(SO₃)₄(NH₄)₄ (2) (а) и разности корреляционных функций $\Delta P = P_{\text{ком}} - P_{\text{ДНК}}$ (б) от радиуса корреляции

стержней работает в ограниченной области импульсов и дает $r_{G(\text{ком})} = 13 \pm 1$ Å. Возможно, увеличение наблюдаемого поперечного размера связано с искривлением цепи ДНК при взаимодействии с ScPc₂(SO₃)₄⁴⁻.

Для более детального представления о действии красителя на конформацию ДНК определена корреляционная функция $\gamma(R) \sim \langle \Delta\rho(0)\Delta\rho(R) \rangle$ обоих растворов (метод регуляризации, пакет ATSAS [27]). На рис. 2, а показана модифицированная функция $P(R) = \gamma(R)R^2$, которая описывает усредненные корреляции молекул в сферических слоях относительно произвольной точки молекулы. Добавление ScPc₂(SO₃)₄⁴⁻ вызывает смещение корреляционной функции в сторону меньших расстояний примерно на 50 Å. Разность корреляционных функций $\Delta P = P_{\text{ком}} - P_{\text{ДНК}}$ положительна при $R < 200$ Å и отрицательна на больших расстояниях (см. рис. 2, б). Пики $P(R)$ при $R < 200$ Å означают, что краситель определенным образом структурирует нить, располагаясь на ней не случайным образом, а на определенных расстояниях, заданных его мольной концентрацией.

Приближение Гинье для ДНК и комплекса ДНК + краситель дает параметры, которые имеют зависимость от температуры. Вместе с тем, рис. 3 показывает, что нагревание до 40 °С не сильно возмущает конформации ДНК и комплекса. Полученная из эксперимента в приближении Гинье интенсивность рассеяния I_0 в пределе малых импульсов пропорциональна дифференциальному сечению рассеяния раствора в единицу телесного угла $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{q \rightarrow 0} = K^2 NV^2$ [26],

где K — фактор ядерного контраста для ДНК в тяжелой воде; N — суммарное число сегментов в молекулах ДНК; $V = LS$ — сухой объем одного сегмента, равный произведению длины сегмента L на его поперечное геометрическое сечение S . Таким образом, интенсивность I_0 пропор-

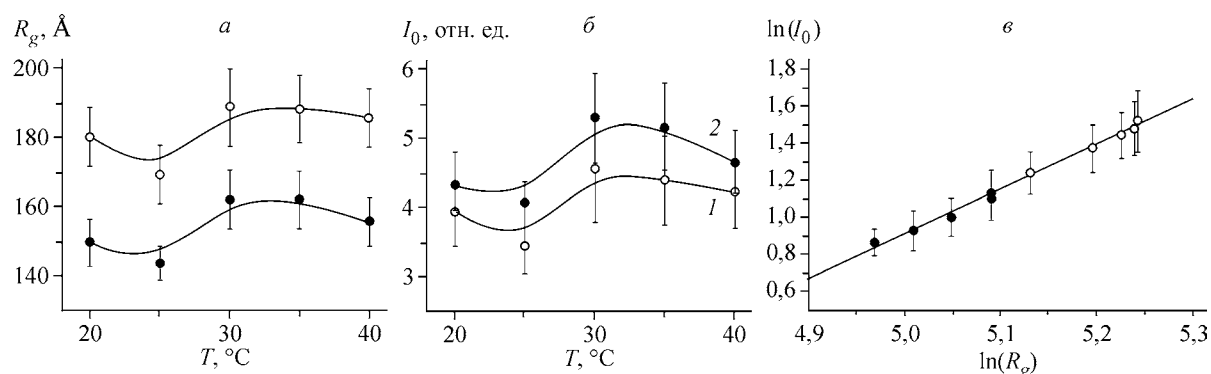


Рис. 3. Температурная зависимость параметров Гинье R_g (а) и I_0 (б) для ДНК (1) и комплекса ДНК + краситель (2), в — единая зависимость $I_0(R_g)$ при условии нормировки данных для комплекса

циональна длине сегмента и квадрату его сечения $I_0 \sim (K^2 L_C) S^2 L$. Здесь $L_C = NL$ — общая контурная длина цепей ДНК в растворе. Следовательно, значения параметров Гинье I_0 и радиуса инерции сегмента $R_g \sim L$ должны коррелировать между собой, что подтверждается экспериментом — например, наблюдается небольшой минимум при 25 °С на графиках температурной зависимости этих параметров как для чистой ДНК, так и для комплекса (см. рис. 3, а, б). В случае присоединения молекул красителя к ДНК увеличивается ее эффективное поперечное сечение S_{eff} , но контурная длина молекулы остается постоянной. Поэтому интенсивность пропорциональна квадрату суммарного объема молекул ДНК с присоединенными молекулами красителя $I_0 \sim (K^2 / L_C) V_i^2 L$, где $V_i = S_{\text{eff}} L_C$, так как факторы контраста для ДНК и красителя близкие [26].

Переходя от объемов растворенных веществ в растворах к их концентрациям, можно записать: $\frac{V_{\text{ДНК+КР}}^2}{V_{\text{ДНК}}^2} = \frac{(C_{\text{ДНК}} + C_{\text{КР}})^2}{C_{\text{ДНК}}^2}$, где $C_{\text{ДНК}}$ и $C_{\text{КР}}$ — весовые концентрации компонентов. Еди-

ная зависимость интенсивности от радиуса инерции $\frac{I_0(T)}{(1 + \alpha C_{\text{КР}} / C_{\text{ДНК}})^2} \sim L \sim R_G(T)$ для ДНК

и комплекса ДНК + краситель получается при условии нормировки значений $I_0(T)$ для комплекса при разных температурах на величину 1,4 (см. рис. 3, в). Долю связанных молекул красителя α в растворе комплекса определяем из отношения квадратов концентраций растворенного вещества в растворах комплекса и чистой ДНК $(C_{\text{ДНК}} + \alpha C_{\text{КР}})^2 / C_{\text{ДНК}}^2 = 1,4$, откуда получаем $\alpha = 0,45$, что доказывает справедливость наших представлений о связывании ДНК и $\text{ScPc}_2(\text{SO}_3)_4$ (красителя) и означает, что около половины молекул красителя участвует в образовании комплекса с ДНК.

Проведено исследование динамического светорассеяния растворов ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 0,0078$ г/дл) и ДНК + краситель ($C_{\text{ДНК}} = 0,0074$ г/дл, $C_{\text{КР}} = 0,0030$ г/дл) в D_2O (1 мМ NH_4Cl) при $T = 20$ °С. Для каждого раствора строили зависимость величины $1/\tau$ от $\sin^2(\theta/2)$ (рис. 4, τ — время релаксации, θ — угол рассеяния), и, используя формулу $1/\tau = C_1 \sin^2(\theta/2) + C_2 \sin^4(\theta/2)$, определяли коэффициент C_1 , пропорциональный коэффициенту диффузии молекулы D_τ , и C_2 , который характеризует диффузию отдельных сегментов молекул в соответствии с моделью Рауза. Затем рассчитывали коэффициент диффузии и гидродинамический радиус частиц:

$$D_\tau = (C_1/2) \lambda_0^2 / (4\pi n)^2,$$

$$R_h = kT / 6\pi \eta_0 D_\tau,$$

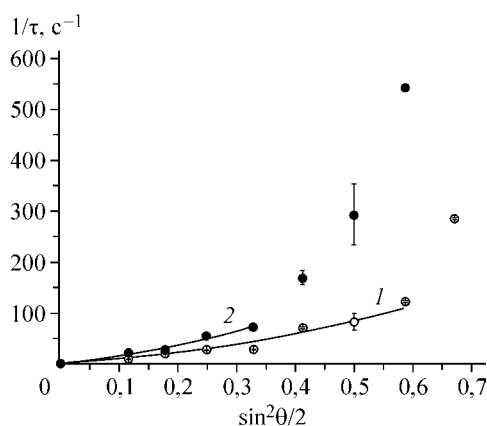


Рис. 4. Зависимость $1/\tau$ от $\sin^2(\theta/2)$ (τ — время релаксации, θ — угол рассеяния) в растворах ДНК (1) и ДНК + краситель (2) по данным динамического рассеяния света

где η_0 — вязкость растворителя; n — измеренный коэффициент преломления, равный 1,328 для обоих растворов.

Для раствора ДНК без красителя получено: $C_1 = (60 \pm 10) \text{ с}^{-1}$, $C_2 = (210 \pm 50) \text{ с}^{-1}$, $D_\tau = 4,19 \times 10^{-14} \text{ м}^2/\text{с}$, $R_h = 5,12 \text{ мкм}$.

Для ДНК с красителем: $C_1 = (110 \pm 30) \text{ с}^{-1}$, $C_2 = (350 \pm 90) \text{ с}^{-1}$, $D_\tau = 7,33 \times 10^{-14} \text{ м}^2/\text{с}$, $R_h = 2,92 \text{ мкм}$.

Видно, что при добавлении красителя произошло уменьшение размеров молекулы ДНК в 1,75 раза, что хорошо согласуется с данными вискозиметрии в легкой воде, полученными ранее [20], и нейтронного рассеяния. Отношение коэффициентов $C_{2(\text{ком})}/C_{2(\text{ДНК})} = 1,6$ означает ускорение диффузии отдельных сегментов и уменьшение их размеров в 1,6 раза, что также согласуется с результатами нейтронного рассеяния.

Полученные с помощью атомной силовой микроскопии изображения содержат объекты (клубки ДНК) с размерами 1—3 мкм, что может быть связано с полидисперсностью ДНК и агрегацией ее молекул при высыхании растворов. Большие размеры молекул в растворе, полученные методом динамического светорассеяния (гидродинамические радиусы R_h 5 и 3 мкм для ДНК и ДНК с красителем соответственно), объясняются набуханием молекул ДНК в растворе или же большей степенью их агрегации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании представленных результатов рассеяния нейтронов и света можно сделать заключение об образовании комплекса сульфированного дифталоцианина скандия с молекулой ДНК в водно-солевом растворе и компактизации ДНК под действием указанного красителя. Комплекс стабилен в области температур 20—40 °С. Формирование комплексов из отрицательно заряженных молекул ДНК и сульфированных дифталоцианинов может быть обусловлено образованием двойного слоя ионов вокруг ДНК, когда первый положительно заряженный слой противоионов притягивает отрицательно заряженные молекулы дифталоцианинов. Можно также предположить изменение конформации ДНК при взаимодействии с дифталоцианинами за счет изменения ее вторичной структуры, что происходит в случае катионных порфиринов, однако предварительные измерения спектров кругового дихроизма растворов ДНК с $\text{ScPc}_2(\text{SO}_3)_4$ или $\text{LuPc}_2(\text{SO}_3)_4$ показали отсутствие индуцированных полос в видимой области спектра, характерных для связывания катионных порфиринов с ДНК [13].

Данные о компактизации ДНК согласуются с результатами, полученными ранее при 20 °С для растворов в легкой воде методами вискозиметрии и спектрофотометрии в видимой области [20].

Авторы благодарят А.И. Сибилева, П.Н. Москалева, М.А. Сибилеву, В.М. Лебедева, Д.Н. Орлову, И.В. Голосовского, В.В. Исаева-Иванова, Ю.Ю. Денисова и Д.В. Лебедева за полезные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьев К.Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. — Минск: Наука и техника, 1968.
2. Linstead P. // J. Chem Soc. — 1934. — P. 1016 — 1017.
3. Barrett P.A., Dent C.E., Linstead R.P. // Ibid. — 1936. — P. 1719 — 1736.
4. Robertson J.M. // Ibid. — 1935. — P. 615 — 621.
5. Robertson J.M. // Ibid. — 1936. — P. 1195 — 1209.
6. Курин И.С., Москалев П.Н., Макашев Ю.А. // Журн. неорганической химии. — 1965. — **10**. — С. 1951 — 1953.
7. Курин И.С., Москалев П.Н., Макашев Ю.А. // Там же. — 1967. — **12**. — С. 707 — 712.
8. Москалев П.Н., Курин И.С. // Там же. — 1970. — **15**. — С. 13 — 15.
9. Москалев П.Н., Курин И.С. // Там же. — 1971. — **16**. — С. 110 — 115.
10. Березин Б.Д. Координационные соединения порфиринов и фталоцианина. — М.: Наука, 1978.
11. Москалев П.Н. // А. с. 196216, СССР // Б. И. — 1967. — № 11. — С. 10.
12. Москалев П.Н., Курин И.С. // А. с. 298579, СССР // Б. И. — 1971. — № 11. — С. 84.

13. Джагаров Б.М., Крук Н.Н., Чирвоный В.С. и др. Успехи химии порфиринов. Т. 2. Гл. 3. – СПб НИИХ СПбГУ, 1999. – С. 50 – 69.
14. Драбкин Г.М., Забиякин В.С., Иоффе А.И. и др. // Препринт ЛИЯФ АН СССР № 1052. – Л., 1985.
15. Клобин В.В., Круглова Л.А., Сибилев А.И. // Коллоидн. журн. – 1991. – **53**, № 1. – С. 39 – 45.
16. Москалев П.Н., Комаров Е.В., Шнейдер М.А. и др. // А. с. 1153536 СССР // Б. И. – 1985. – № 37. – С. 257.
17. Москалев П.Н. // Координац. химия. – 1990. – **16**, № 2. – С. 147 – 158.
18. Кульвелис Ю.В., Сибилева М.А., Сибилев А.И. и др. // Тез. докл. III Всерос. Каргинской конф. "Полимеры-2004". 27 янв. – 2 февр. 2004 г. Москва, МГУ. Т. 1. Секция 2. – М., 2004. – С. 303.
19. Сибилев А.И., Москалев П.Н., Кульвелис Ю.В., Сибилева М.А. // Там же. – С. 366.
20. Sibileva M.A., Kul'velis Yu.V., Sibilev A.I., Moskalev P.N. // Russ. J. Phys. Chem. – 2005. – **79**. Suppl. 1. – P. S60 – S65.
21. Кульвелис Ю.В., Лебедев В.Т., Торок Д. и др. // Тез. докл. I Всерос. школы-конф. "Молодые ученые — новой России. Фундаментальные исследования в области химии и инновационная деятельность". Иваново, 26–29 сент. 2005. – С. 131.
22. Курин И.С., Москалев П.Н. // Журн. неорган. химии. – 1971. – **16**. – С. 3179 – 3181.
23. Neutron scattering facilities at Budapest's modernized reactor / Ed. L. Fragnod, L. Rosta, Gy. Torok. – Budapest, 1991.
24. Hansma H.G., Laney D.E., Bezanilla M., Sinsheimer R.L. // Biophys. J. – 1995. – **68**. – P. 1672 – 1677.
25. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул. – М.: Наука, 1989.
26. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. – М.: Наука, 1986.
27. Svergun D.I. // J. Appl. Crystallogr. – 1992. – **25**. – P. 495 – 503.