

## НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНСТАНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ИЗ СПЕКТРА ТИТРОВАНИЯ

*Предложен экспресс-метод определения термодинамических параметров связывания низкомолекулярных биологических активных соединений (лиганд) с нуклеиновыми кислотами. Предложенный метод дает возможность при малых концентрациях нуклеиновых кислот, используя незначительное количество лигандов, оценить константу связывания лиганда с нуклеиновыми кислотами. Он позволяет за короткий срок с малыми затратами исследовать ряд фармакологически активных соединений и на этой основе сделать выбор для дальнейшего более детального клинического испытания.*

**Ключевые слова:** лиганды, малые заполнения, константа связывания, число мест связывания

Связывание малых молекул с нуклеиновыми кислотами (НК) играет важную роль в жизнедеятельности клетки. В подавляющем большинстве случаев адсорбированная молекула не диффундирует по поверхности НК, т. е. имеет место локализованное связывание. Характерные термодинамические параметры связывания - константа связывания  $k$  и число оснований, занимаемых одним адсорбированным лигандом  $n$ , обычно определяют экспериментально из анализа изотерм адсорбции, построенных в координатах Скэчарда [1-3]. Однако, очень часто из-за слабого связывания невозможно точно определить физические параметры полностью связанного состояния и поэтому на основе этих данных построенная изотерма адсорбции получается приближенной и из общепринятого представления изотерм абсорбции можно определить лишь приближенные значения константы связывания  $k$  и число мест связывания  $n$ .

Для более точного определения величины константы связывания  $k$  предложен новый, простой и легко доступный метод обработки кривых, в частности, спектрофотометрического (флуориметрического) титрования. При постоянной концентрации лиганда в растворе с увеличением концентрации НК наблюдается монотонное уменьшение относительной величины абсорбции. В случае малых заполнений когда в растворе полимер в избытке, т.е. при достаточно малых значениях  $r = \frac{C_b}{C_p}$ , где  $C_p$ ,  $C_b$  - концентрации полимера и связанного лиганда, взаимодействием между связанными с полимером молекулами лиганда можно пренебречь, и для определения термодинамических параметров комплексообразования  $k$  и  $n$  определить при помощи уравнения [1]

$$\frac{r}{C_f} = k(1 - nr) \left[ \frac{(2\omega - 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right]^{n-1} \left[ \frac{1 - (n+1)r + R}{2(1 - nr)} \right]^2, \quad (1)$$

где  $R = \{[1 - (n + 1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr)\}^{\frac{1}{2}}$ ,  $C_f$  - концентрация свободного лиганда. Учитывая, что в этих условиях  $nr \ll 1$  (малые заполнения),  $\omega = 1$  (при малых заполнениях антикооперативностью взаимодействия можно пренебречь), уравнение (1) можно представить в виде

$$\frac{r}{c_f} \cong k \quad \text{или} \quad \frac{c_b}{c_f c_p} \cong k \quad . \quad (2)$$

Если суммарная концентрация лигандов в растворе  $c_0 = c_f + c_v$ , то уравнение (2) принимает вид

$$\frac{c_b}{c_0} \cong \frac{k c_p}{1 + k c_p} \quad . \quad (3)$$

Относительную интенсивность поглощения  $\frac{A_0}{A}$ , где  $A_0$  – величина поглощения свободного лиганда, а  $A$  – поглощение комплекса полимера с лигандом при максимуме длин волн поглощения в видимой области спектра, где полимер не поглощает, можно выразить следующим образом:

$$\frac{A_0}{A} = \frac{c_f}{c_0} + B \frac{c_b}{c_0} = 1 + (B - 1) \frac{c_b}{c_0} \quad , \quad (4)$$

где  $B$  – отношение величин поглощения лиганда в свободном и связанном состояниях. Из уравнения (3) и (4) имеем

$$\frac{A_0}{A} \cong 1 + (B - 1) \frac{k c_p}{1 + k c_p} \quad ,$$

которое можно переписать в виде

$$\frac{A}{A_0 - A} \cong \frac{1}{B - 1} + \frac{1}{k(B - 1) c_p} \quad . \quad (5)$$

Как следует из уравнения (5), зависимость  $\frac{A_0}{A - A_0}$  от  $\frac{1}{c_p}$  должна быть приблизительно линейной и из этой зависимости можно определить значение  $B$  и  $k$ .

Используя приведенные в работах [2-5] флуориметрические и спектрофотометрические кривые титрования, определяли константу связывания бромистого этидия с синтетическими полинуклеотидами, которые находятся в различных структурных состояниях. В табл. приведены значения  $k$ , определенные общепринятым способом [1-2] и по (5).

**Таблица**

**Константа связывания бромистого этидия с полинуклеотидами при 0,1M NaCl, 0,01M, Три рН=7,5, 25°C**

Полунуклеотид	Форма	$k, M^{-1}$ по формуле (1)	$k, M^{-1}$ по формуле (5)
Поли (G)	Четырехцепочечная	$(5,2 \pm 0,4) 10^4$ [3]	$(5,0 \pm 0,3) 10^4$
Поли (G) поли (C)	Двухспиральная	$(0,8 \pm 0,2) 10^3$ [2]	$(1,0 \pm 0,2) 10^3$
Поли (A) поли (U)	-	$(2,5 \pm 0,3) 10^6$ [4]	$(2,2 \pm 0,4) 10^6$
Поли (I) поли (C)	-	$(1,5 \pm 0,3) 10^4$ [4]	$(1,6 \pm 0,2) 10^4$

Из табл. следует, что значение  $k$ , полученное при помощи формулы (5), по порядку совпадает со значением, полученным из изотерм абсорции по методу Скэдчарда [1]. Вычислить значение  $k$  из изотерм абсорции по методу Скэдчарда довольно трудно, так как для ее определения необходимо знать физические характеристики (например, квантовый выход или поглощение) свободного и полностью связанного состояний. Достигнуть полностью связанного

состояния иногда бывает невозможно или в случае достижения этого состояния затрачивается большое количество НК. А для определения константы связывания  $k$  предложенным здесь способом при помощи (5) необходимо иметь значения поглощения комплексов только нескольких экспериментальных измерений при малых заполнениях (при малых заполнениях количество используемой НК очень мало). Таким образом, при помощи предложенного экспресс-метода с малыми затратами времени и драгоценных веществ можно выбрать подходящий лиганд для дальнейшего, более детального исследования на практике.

Յու.Ս. Բաբայան,  
Մ. Ա.Թորոսյան

### ՏՆՏՐՄԱՆ ՍՊԵԿՏՐԻ ՄԻՋՈՑՈՎ ԿԱՊՄԱՆ ՀԱՍՏԱՏՈՒՆԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ԵՈՐ ՄԵԹՈՂ

*Ներկայացված է կենսաբանական ակտիվ ցածրամոլեկուլային միացությունների (լիգանդների) նուկլեինաթթուների հետ կապման ջերմոդինամիկական պարամետրերի որոշման արագ մեթոդ, որը հնարավորություն է տալիս նուկլեինաթթուների փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում, օգտագործելով լիգանդի շատ քիչ քանակություններ, կարճ ժամանակամիջոցում գնահատել նուկլեինաթթվի հետ լիգանդի կապման հաստատունը: Ստացված արժեքների հիման վրա կարելի է որոշել կոմպլեքսագոյացման ջերմադինամիկական պարամետրերը, որը թույլ կտա կենսաբանական ակտիվ միացություններից ընտրություն կատարել, հետազայում դրանց կլինիկական փորձարկման համար:*

**Առանցքային բառեր.** *լիգանդ, փոքր լցումներ, կապման հաստատուն, կապման տեղերի թիվ*

Yu. S.Babayan,  
M. A.Torosyan

### A NEW METHOD FOR DETERMINING THE BINDING CONSTANT FROM THE SPECTRUM OF TITRATION

*Express-method for determination of the thermodynamic parameters of the binding of low molecular biologically active compounds (ligand) with nucleic acids are proposed. The proposed method makes it possible, at low concentrations of nucleic acids using a small number of ligands to evaluate the binding constant of the ligand with nucleic acids. It to investigate a number of pharmacologically active compounds allows for short time at low cost and on this basis to make a choice for further detailed clinical tests.*

**Keywords:** *ligand, small filling, binding constant, number of binding sites*

### Литература

1. McGhee J.D., von Hippel P.H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // J. Mol.Biol.

– 1974. - V.86. –P. 469-489.

2. Babayan Yu. S., Manzini G., Hodo L.E., Quadzifoglio F. Base specificity in the interaction of ethidium with synthetic polyribonucleotides // Nucleic Acids Res. – 1987. - V. 15, N14. - P.5803-5812.
3. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Minasyants M.V. Ethidium Bromide interaction with paly-G // Biophys. Rev. Let. – 2014. - V. 9, N3. – P. 239-247.
4. Бабаян Ю.С. Устойчивость нуклеиновых кислот при взаимодействии с биологически активными веществами: Дис. ... д-ра физ.-мат.наук. – М.: МГУ, 1991. -213 с.
5. Karapetyan A.T., Mehrabyan N.M., Terzikyan G.A., Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Borisowa O.F. and Frank-Kamenetskii M.D. Theoretical Treatment of Melting of Complexes of DNA with ligand Having Several Types of Binding Sites on Helical and Single-stranded DNA // J.Biomol.Struct.Dyn. – 1996. – V.14. – P.275-283.

Работа осуществлена в рамках программы "Выявление, уточнение, разработка предложений и рекомендаций по внедрению путей устойчивого развития архитектурного и строительного комплексов РА с применением постоянного мониторинга" по базовому финансированию из госбюджета РА научной и научно-технической деятельности.

*Բարիսյան Յուրիկ Ստեփանի, Ծ-Վ.գ.դ., պրոֆ. (ՀՀ, ք. Երևան) - ՃՇՀԱՀ, ակ. Ալ. Թամանյանի անվան Ճարտարապետության և շինարարության պրոբլեմային լաբորատորիա, փ.գ.ա., Ֆիզիկայի և էլեկտրատեխնիկայի ամբիոն, (+374) 010580691, [akarapetyan@nuaca.am](mailto:akarapetyan@nuaca.am), Թորոսյան Մարգարիտա Անդրեյի (ՀՀ, ք. Երևան) - ՃՇՀԱՀ, ակ. Ալ. Թամանյանի անվան Ճարտարապետության և շինարարության պրոբլեմային լաբորատորիա, գ.ա, Ֆիզիկայի և էլեկտրատեխնիկայի ամբիոն, լաբորատորիայի վարիչ, (+374) 010580691, [akarapetyan@nuaca.am](mailto:akarapetyan@nuaca.am):*

*Бабаян Юрий Степанович, д.ф-м.н, проф. (РА, г. Ереван) - НУАСА, Проблемная лаборатория Архитектуры и строительства им. академика Ал. Таманяна, с.н.с., кафедра Физики и электротехники, (+374) 010580691, [akarapetyan@ysuac.am](mailto:akarapetyan@ysuac.am), Маргарита Андреевна Торосян (РА, г. Ереван) - НУАСА, Проблемная лаборатория Архитектуры и строительства им. ак.Ал. Таманяна, м.н.с., кафедра Физики и электротехники, зав. лабораторией, (+374) 010580691, [akarapetyan@nuaca.am](mailto:akarapetyan@nuaca.am).*

*Babayan Yurik Stepan, doctor of Phys.-Math. Sciences, prof. (RA, Yerevan) - NUACA, Research Laboratory of Architecture and Building by Academician Al. Tamanyan, senior researcher, chair of phys. electroeng. (+374) 010580691, [akarapetyan@ysuac.am](mailto:akarapetyan@ysuac.am), Torosyan Margarita Andrey (RA, Yerevan) - NUACA, Research Laboratory of Architecture and Building by Academician Al. Tamanyan, Scientific Researcher, Chair of Phisics and Electric Engineering, head of laboratory, (+374) 010580691, [akarapetyan@nuaca.am](mailto:akarapetyan@nuaca.am).*

*Ներկայացվել է՝ 05.05.2015թ.*

*Ընդունվել է տպագրության՝ 15.05.2015թ*