

УДК 535.34;37

Кутовий С.Ю.¹, к.ф.-м.н., доц.,
Сич Т.П.², студ.
Заїка Л.А.³, к.б.н., с.н.с.

Особливості зв'язування бромистого етидію та акридинового оранжевого з ДНК

^{1,2}Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13
e-mail: ¹sangulaire@gmail.com
³Інститут молекулярної біології та генетики, Україна, м.Київ, вул. акад. Заболотного, 150.

S. Kutovyy¹, PhD, assoc.prof.
T. Sych², stud.
L. Zaika³, PhD, sen.sci.res.

Peculiarities of ethidium bromide and acridine orange binding to DNA

^{1,2}Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska Street, Kyiv, Ukraine, 01601.
e-mail: ¹sangulaire@gmail.com
³Institute of Molecular Biology and Genetics, 150, Acad. Zabolotnyi Str., Kyiv, Ukraine

Представлено результати порівняльного дослідження методами оптичної спектроскопії взаємодії бромистого етидію (фенантретрени), акридинового оранжевого (піридину) з ДНК в водних розчинах. Розглянуто залежності спектральних характеристик барвників від концентраційних співвідношень P/D між кількістю пар основ ДНК та кількістю молекул барвника у розчині. Показано, що характер зв'язування залежить від P/D. Визначено параметри зв'язування для зовнішнього зв'язування та інтеркаляції з використанням модифікованих рівнянь Скетчарда та МакГі-фон Хіппеля. Показано вплив форми ліганду на тип зв'язування.

Ключові слова: ДНК, ліганд, рівняння зв'язування, інтеркаляція, зовнішнє зв'язування.

The comparative study the interaction of ethidium bromide, acridine orange with DNA in aqueous solutions using the optical spectroscopy methods (absorption and fluorescence) is presented. The dependencies of ligands spectral characteristics on the concentration ratio P/D between the DNA base pairs and ligands molecules in the solutions were studied in the P/D range of 0...20. The character of binding is found to depend on P/D. Some specific features in binding process at small values of P/D were observed. The changes in optical parameters (the extinction coefficient, fluorescence intensity) were analyzed using a special program operating with the modified Scatchard and McGhee-von Hippel binding equations. The parameters of the binding with DNA are determined for external binding and intercalation. It was found that for acridine orange the dependencies of the optical parameters on P/D have a minimum at small P/D. The model of two binding modes was applied and it was established that the external binding takes place at small values of P/D (≤ 1) and intercalation at $P/D \geq 2$. For ethidium bromide the dependence of the optical parameters on P/D has an s-like form at small P/D. It was found the only intercalation mode of binding for ethidium bromide but under essential influence of pH. The general conclusion about the influence of ligand form on binding ways was done.

Key Words: DNA, ligand, binding equations, intercalation, external binding.

Статтю представив академік НАН України, д.ф.-м.н., проф. Булавін Л.А.

1. Вступ

На даний момент існує низка порівняно токсичних препаратів, що викликають руйнацію пухлинної клітини, зв'язуючись з ДНК, а тому вивчення процесів взаємодії між малими лігандами та ДНК є дуже важливим для створення ефективних малотоксичних протипухлинних препаратів на базі натуральних алкалоїдів.

Ця робота продовжує наші дослідження [1], що стосуються вивчення процесів зв'язування ДНК та малих лігандів. Об'єктами дослідження є

бромистий етидій (EtBr, структурна група фенантретренив) та акридиновий оранжевий (АО, група піридинів). Структурні формули, акридинового оранжевого - $C_{17}H_{19}N_3$, бромистого етидію - $C_{21}H_{20}BrN_3$ представлено на рис. 1. Барвники EtBr та АО добре зв'язуються з ДНК та використовуються як флуоресцентні мітки.

Обидва можуть бути використані як «модельні» зразки для дослідження зв'язування малих лігандів з нуклеїновими кислотами. Взаємодія лігандів EtBr та АО з ДНК вивчалась в

багатьох роботах, зокрема [2-4]. EtBr та АО взаємодіють з ДНК як інтеркалятори, повні чи часткові. Зазвичай експериментальні результати процесів зв'язування аналізують за допомогою графіків в координатах Скетчарда. Проте використання цих координат має ряд суттєвих недоліків [1,5]. Крім того, незважаючи на значну кількість робіт стосовно обраних зразків, деякі суттєві особливості їхніх оптичних спектрів, і, відповідно, кривих зв'язування не були описані в літературі.

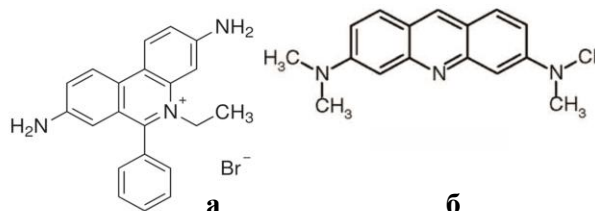


Рис. 1. Бромистий етидій (а) та акридиновий оранжевий (б).

У цій роботі було отримано залежності спектральних характеристик EtBr та АО від співвідношення (P/D) між кількістю пар основ ДНК та кількістю молекул ліганду. Ці характеристики були використані для визначення параметрів зв'язування за допомогою, як ми вважаємо, коректної системи модифікованих рівнянь Скетчарда та МакГі-фон Хіппеля з незалежними змінними.

2. Зразки та техніка експерименту

Було використано барвники бромистий етидій та акридиновий оранжевий у формі мікрочастинчастих порошоків (надані ІМБГ НАНУ). Останні були розчинені у воді для ін'єкцій при кімнатній температурі. Концентрація лігандів варіювалась в межах 6...50 мкМ. Використовувалась ДНК *calif thymus* ("Serva", Heidelberg, Germany). Середня молярна маса пари нуклеотидів становила близько 650 Da. При вимірах концентрація лігандів в розчинах ліганд+ДНК була сталою, а концентрація ДНК – змінною. Співвідношення між молярними концентраціями ДНК та лігандів (P/D) було виражене як відношення кількості пар нуклеотидів на одну молекулу ліганду.

Спектри поглинання були записані на спектрофотометрі *Specord UV VIS* в діапазоні 200–700 нм, роздільна здатність – 1 нм. Спектри флуоресценції (ФЛ) в діапазоні 300–800 нм було отримано з використанням флуорометра *Sary Eclipse*. Спектральна ширина щілини для флуоресцентних вимірів становила 5 нм.

3. Обчислення параметрів зв'язування

Параметри зв'язування визначались за допомогою спеціально розробленої програми *BindFit*. Її особливістю є пряма робота з експериментальними даними, тобто відсутність будь-яких перетворень координат, відомих як "лінеаризація". Це дозволило підвищити точність визначення параметрів для процесів, що описуються нелінійними графіками навіть після лінеаризації. Головний принцип обробки даних за допомогою цієї програми – апроксимація експериментальних точок за допомогою деякого рівняння зв'язування. Класичним є рівняння Скетчарда [6]:

$$\frac{v}{c_f} = K \cdot (1 - v) \quad (1)$$

де v - співвідношення між концентрацією зв'язаних лігандів c_b і загальною кількістю місць зв'язування N , c_f - концентрація вільних лігандів, K - константа зв'язування. З певних причин ця залежність може бути нелінійною, зокрема, якщо молекула ліганду займає більш ніж одне місце зв'язування (а саме n місць) на матриці ДНК. Тоді рівняння виглядає як $v/c_f = K \cdot (1 - nv)$, але і воно не завжди є коректним (зокрема, із-за заниження загальної кількості вільних місць зв'язування). МакГі та фон Хіппель [7] з використанням теорії ймовірності удосконалили підхід Скетчарда, поширивши його на випадок для $n > 1$. Крім того, вони коректно визначили кількість вільних місць зв'язування. Рівняння МакГі-фон Хіппеля для некооперативного та кооперативного зв'язування, відповідно:

$$\frac{v}{c_f} = K(1 - nv) \cdot \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1} \quad (2)$$

$$\frac{v}{c_f} = K \cdot (1 - nv) \cdot \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - nv) + v - R}{2(\omega - 1)(1 - nv)} \right)^{n-1} \cdot \left(\frac{1 - (n+1)v + R}{2(1 - nv)} \right)^2 \quad (3)$$

де ω – параметр кооперативності,

$$R = \sqrt{(1 - (n+1)v)^2 + 4\omega v(1 - nv)}.$$

Модифіковані рівняння.

Один тип місць зв'язування. Спершу рівняння МакГі – фон Хіппеля були перетворені з їхньої оригінальної форми (2,3) до такої, яка включала в себе лише змінні, що отримувались безпосередньо з експерименту. Як правило, експериментально вимірюється залежність певного оптичного параметра розчину від концентраційного співвідношення розчинених компонент, зазвичай, це співвідношення між загальною концентрацією місць зв'язування та загальною концентрацією

лігандів, N/c (тут $N/c \equiv P/D$). Ці концентрації, на відміну від концентрацій зв'язаних чи вільних лігандів, є відомими. Тому такі змінні як загальна концентрація лігандів, c , і місць зв'язування, N , є більш доцільними для комп'ютеризованого процесу. У цьому випадку, залишається лише

$$K \cdot (c - c_b) \cdot (N - nc_b) \cdot \left(\frac{N - nc_b}{N - (n-1)c_b} \right)^{n-1} - c_b = 0 \quad (4)$$

$$K \cdot (c - c_b) \cdot (N - nc_b) \cdot \left(\frac{(2\omega - 1)(N - nc_b) + c_b - R'}{2(\omega - 1)(N - nc_b)} \right)^{n-1} \cdot \left(\frac{N - (n+1)c_b + R'}{2(N - nc_b)} \right)^2 - c_b = 0$$

$$R' = \sqrt{(N - (n+1)c_b)^2 + 4\omega c_b (N - nc_b)} \quad (5)$$

Ці рівняння були реалізовані в програмі і розв'язані чисельно. Це дозволило працювати з концентрацією c_b як з функцією $c_b = c_b(N, c; K, n)$.

Два типи місць зв'язування. У цьому випадку процеси зв'язування описуються за допомогою системи рівнянь, яка повинна брати до уваги, чи є процеси зв'язування лігандів, які займають одне місце зв'язування (тобто пари основ і фосфати), взаємозалежними чи ні. Якщо параметр N позначає концентрацію пар основ ДНК, то $2N$ місць зв'язування відповідає за перший тип зв'язування (з фосфатом) і N місць зв'язування – за другий тип (інтеркаляція).

Для наших експериментальних даних найкращі результати апроксимації були отримані з

$$\begin{cases} c_b^{(1)} = K_1 (c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)}) \cdot (2N - c_b^{(1)}) \cdot \left(1 - \frac{c_b^{(2)}}{N} \right) \\ c_b^{(2)} = K_2 (c - c_b^{(1)} - c_b^{(2)}) \cdot (N - nc_b^{(2)}) \cdot \left(\frac{N - nc_b^{(2)}}{N - (n-1)c_b^{(2)}} \right)^{n-1} \cdot \left(1 - \frac{c_b^{(1)}}{2N} \right)^2 \end{cases} \quad (6)$$

де $c_b^{(1)}$ і $c_b^{(2)}$ – концентрації лігандів, зв'язаних з місцями першого і другого типу, K_1 і K_2 – константи зв'язування для зовнішнього зв'язування та інтеркаляції відповідно. Важливо, що додатковий множник виникає в рівняннях для незалежних процесів; були і деякі важливі обмеження [1]. Крім того, у програмі було враховано фактор рН розчину (тобто вміст іонів H^+); це дало можливість точніше визначати кількість зовнішніх місць зв'язування (не лише $2N$). Загалом, рівняння мають кілька розв'язків, проте, лише один з них задовольняє необхідним обмеженням у робочому діапазоні параметрів.

Детальніше про модифіковані рівняння зв'язування див. [1].

4. Експериментальні результати

Взаємодія малих лігандів з ДНК супроводжується у спектрах поглинання та флюоресценції явищем гіпохромізму смуг

одна невідома змінна у рівнянні, яка може бути визначена чисельно. Проведенням ряду простих перетворень рівняння МакГі–фон Хіппеля для некооперативного та кооперативного зв'язування зводяться до виразів, що містять змінну c_b :

використанням системи модифікованих рівнянь Скетчарда (для зовнішнього зв'язування) і МакГі–фон Хіппеля (для інтеркаляції). Система описує два незалежні процеси зв'язування лігандів, що займають одне місце зв'язування. Інтеркаляція в інтервал між пари основ можлива лише при умові, що обидва фосфати не зв'язані з лігандом і навпаки, тобто зв'язування з фосфатами можливе лише тоді, якщо жоден ліганд не інтеркалював у відповідний інтервал. На додачу, процес прямого переходу зв'язаного ліганду з місця першого типу до місця другого типу є неможливим і повинно бути не менше ніж $n-1$ вільних інтервалів між двома лігандами, що інтеркалювали. Ця модель приводить до наступної системи рівнянь:

поглинання, червоним та блакитним зсувами максимумів смуг поглинання та флюоресценції відповідно, а також зміною квантового виходу ФЛ. Ці та інші прояви взаємодії EtBr та АО з ДНК спостерігались в оптичних спектрах.

Параметри зв'язування. Параметри зв'язування EtBr та АО з ДНК було визначено за спектрами флюоресценції. Для опису процесів зв'язування найбільш коректно виявилась система (6) рівнянь Скетчарда та МакГі–фон Хіппеля. Параметри зв'язування для порівняння були взяті з інших робіт, де вони були отримані також для ДНК *calf thymus*.

Бромистий етидій. Спектр ФЛ водного розчину EtBr містить одну смугу з максимумом на 614 нм. В присутності ДНК інтенсивність ФЛ EtBr зростає більш ніж у 10 разів з ростом концентрації ДНК у розчині. Спостерігався блакитний зсув до 14 нм (рис. 2а). Криві зв'язування (залежність I_{max} від P/D) представлені на рис. 2б.

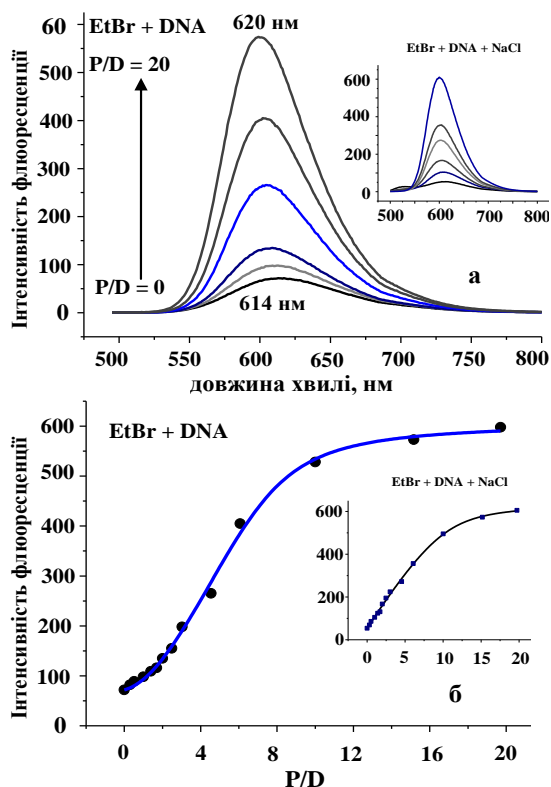


Рис. 2. Спектр флюоресценції (а) та криві зв'язування (б) бромистого етидію ($c_{\text{EtBr}} = 6.6 \text{ мкМ}$, $c_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ М}$).

Крива зв'язування EtBr з ДНК має s-подібну форму в області малих P/D. Така форма може бути результатом присутності у розчині іншого типу лігандів. Останніми можуть бути йони H^+ або агрегати бромистого етидію. З додаванням NaCl до розчину s-подібна форма кривої зв'язування зникає, ймовірно за рахунок виключення з процесу зв'язування іншого типу лігандів. Монотонне зростання кривої зв'язування означає, що бромистий етидій лише інтеркалює, а із зовнішніми фосфатними групами практично не зв'язується.

На основі експериментальних даних було обчислено параметри зв'язування. Для опису процесу зв'язування було використано систему взаємозалежних рівнянь Скетчарда та МакГі-фон Хіппеля. Отримані значення: $K_1 = (7.4 \pm 1.5) \cdot 10^2 \text{ М}^{-1}$, $K_2 = (1.2 \pm 0.3) \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$, $n = 5.7 \pm 1.1$ (два типи зв'язування); $K_2 = (3.8 \pm 0.9) \cdot 10^6 \text{ М}^{-1}$, $n = 6.6 \pm 1.2$ (один тип зв'язування).

Для порівняння, у роботі [2] значення константи зв'язування для інтеркаляції $K = 1.5 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$ (без NaCl) і $K = 3 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1}$ (з NaCl) були отримані на основі аналізу рівняння Скетчарда, і добре співпадають з нашими результатами. У [8] за допомогою методів УФ-спектроскопії було отримано значення $K = 6.58 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}$.

Акридиновий оранжевий. Спектри флюоресценції водного розчину АО+ДНК при різних P/D представлені на рис. 3а. Спектр має одну смугу з максимумом на 528 нм. При додаванні ДНК до розчину спостерігався незначний блакитний зсув ($\sim 2 \text{ нм}$).

області малих P/D інтенсивність ФЛ змінювалась немонотонно (рис. 3 б): крива зв'язування мала мінімум при $P/D \sim 0.5$. Така ж поведінка спостерігалась і для сангвінаруну [9]. Зменшення інтенсивності ФЛ в області малих P/D вказує на інший (зовнішній) механізм зв'язування АО та ДНК. Це означає, що АО зв'язується з ДНК двома способами – зовнішнім зв'язуванням та інтеркаляцією. У присутності NaCl (0.1 М) залежність інтенсивності ФЛ від P/D не має мінімуму: NaCl виключає зовнішні місця зв'язування.

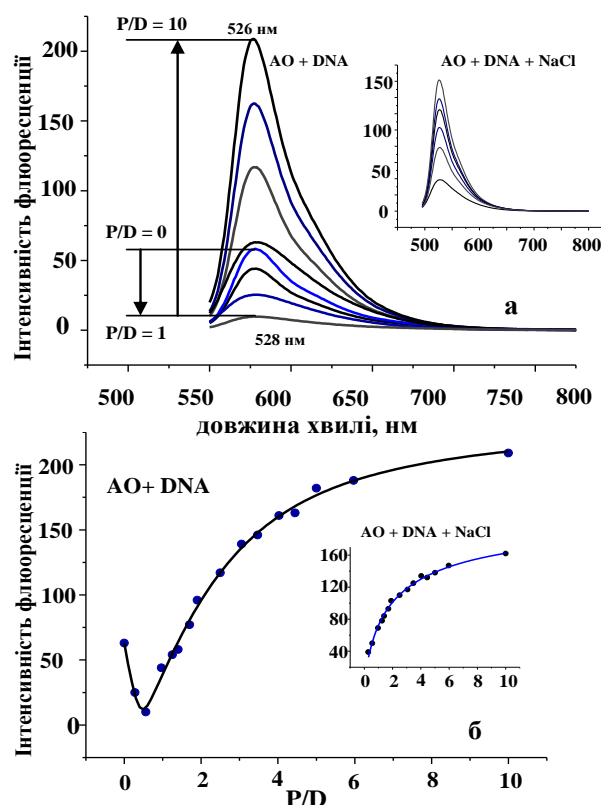


Рис. 3. Спектри флюоресценції (а) та криві зв'язування (б) акридинового оранжевого ($c_{\text{EtBr}} = 6.6 \text{ мкМ}$, $c_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ М}$)

Варто зауважити, що в роботі [4] було зроблено якісне пояснення різних процесів зв'язування, і ці пояснення аналогічні до наших, наданих пізніше для сангвінаруну [1]. Крім того, у [4] константи зв'язування були визначені для випадків без/з NaCl з використанням координат Скетчарда, і константи для інтеркаляції добре співпадають з нашими результатами, отриманими за допомогою системи рівнянь Скетчарда та МакГі-фонХіппеля.

$K_1 = (3.0 \pm 1.0) 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = (1.8 \pm 0.2) 10^6 \text{ M}^{-1}$,
 $n = 3.2 \pm 0.3$ (два типи зв'язування, без NaCl);
 $K_2 = (1.4 \pm 0.1) 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 3.4 \pm 1.1$ (один тип
зв'язування, з NaCl).

Результати [4]: $K_2 = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n \sim 2.5$ (два
типи зв'язування, без NaCl); $K_2 = 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n \sim 2$
(один тип зв'язування, з NaCl). Для порівняння, у
[8] з даних УФ-спектроскопії було отримане
значення $K = 2.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Спектри поляризованої флюоресценції.
Здатність до переорієнтації дипольного моменту
молекули у нев'язких розчинах при поглинанні та
випромінюванні світла може слугувати зручним
параметром для опису зв'язування, а саме рівня
фіксації молекули на матриці ДНК.

Вільний барвник має мінімальний ступінь
анізотропії, оскільки найбільш схильний до
броунівських ротацій. При взаємодії з ДНК алка-
лоїд втрачає здатність здійснювати броунівські
ротації, тому ступінь анизотропії повинен
зростати. Для найбільш довгохвильової смуги
поглинання та смуги флюоресценції, тобто при
початковій паралельній орієнтації дипольних
моментів поглинання та флюоресценції,
максимальним значенням ступеня анизотропії
може бути $r = 0.4$, що означає практично повну
фіксацію молекули на матриці ДНК.

Бромистий етидид. Як впливає з
обчислень параметрів зв'язування, EtBr взаємодіє
з молекулою ДНК лише способом інтеркаляції, а
в зв'язуванні зовнішнього типу участі не бере. У
вільному стані ступінь анизотропії рівний нулю,
що і було отримано для розчину з $P/D = 0$. При
додаванні ДНК, ступінь анизотропії зростає зі
збільшенням P/D .

Ступінь анизотропії спектру флюоресценції є
сталим на всьому проміжку довжин хвиль і
показує ступінь фіксації молекули на матриці
ДНК, бо основні причини деполаризації
молекули пов'язані саме зі здатністю до руху
(броунівських ротацій). Залежність ступеня
анізотропії EtBr від P/D подано на рис. 4.

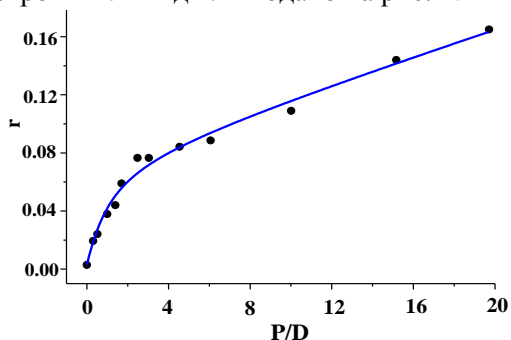


Рис. 4. Залежність ступеня анизотропії
розчину бромистого етидію та ДНК від P/D .

З рисунка видно, що для даного барвника
ступінь анизотропії зростає при збільшенні
концентрації ДНК у розчині. Оскільки для EtBr
домінуючим є зв'язування за інтеркаляційним
механізмом, то при збільшенні P/D все більша
кількість молекул інтеркалює, а, отже, міцніше
фіксується на матриці ДНК, що і є причиною
монотонного зростання ступеня анизотропії.

Акридиновий оранжевий. Для цього
барвника при малих P/D характерним є зовнішній
тип зв'язування, при більших – домінує
інтеркаляція. Оскільки рухливість молекули
барвника зменшується незалежно від способу
фіксації на матриці ДНК, то ступінь анизотропії

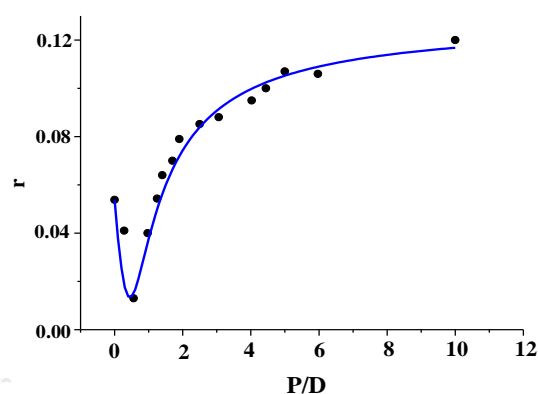


Рис. 5. Залежність ступеня анизотропії
розчину АО та ДНК від P/D .

мав би монотонно зростати. Проте, як виявилось,
при $P/D \sim 1.5$ крива має мінімум (рис. 5). Однією
з причин такої залежності може бути багатоком-
понентність суміші (агрегати з різною енерге-
тичною структурою, зокрема, димери), іншою -
те, що при малих P/D зв'язування з ДНК міняє
початкову орієнтацію дипольних моментів пере-
ходу при поглинанні та флюоресценції для АО.

Помітний вихід на насичення залежності
 $r(P/D)$ свідчить про те, що вже при $P/D = 10$
більшість молекул акридинового оранжевого
фіксуються на матриці ДНК.

5. Висновки

Методами оптичної спектроскопії водних
розчинів бромистого етидію та акридинового
оранжевого встановлено способи зв'язування та
обчислено параметри зв'язування барвників з ДНК.

Визначено, що для досліджених зразків, в
залежності від структури молекули, характерні
різні типи зв'язування: для акридинового
оранжевого – інтеркаляція та зовнішнє
зв'язування; для бромистого етидію – лише
інтеркаляція. Крива зв'язування для акридину має
мінімум при малих P/D . Крива зв'язування для
бромистого етидію при малих P/D має s-подібну

форму, що може бути спричинено присутністю іонів H^+ або агрегатів барвника. Присутність NaCl виключає зовнішні місця зв'язування для акридину і прибирає s-подібність кривої зв'язування для етидію. Дотепер діапазон малих значень P/D практично не досліджений; вказані ефекти (зовнішнє зв'язування для АО та s-подібність кривої для EtBr) зафіксовано вперше.

Комп'ютерна програма для апроксимації експериментальних результатів та рівняння зв'язування були вдосконалені додаванням параметрів для врахування рН розчину, що дало змогу підвищити точність визначення параметрів зв'язування.

Список використаних джерел

1. *Gumeniuk V.* Binding Parameters of Alkaloids Berberine and Sanguinarine with DNA / V. Gumeniuk, N. Bashmakova, S. Kutovyy, V. Yashchuk, L. Zaika // *Ukr. J. Phys.* – 2011. – **56**. – P.524-533.
2. *Houssier C.* Interaction of Ethidium Bromide with DNA. Optical and Electrooptical Study / C. Houssier, B. Hardy, E. Fredericq // *Biorolymers* – 1974. – **13**. – P.1141-1160.
3. *Urbanova J.* Fluorescence properties of selected benzo[c]phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA / J. Urbanova, P. Lubal, I. Slaninova, E. Taborska, P. Taborsky // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – **394**. – p.997-1002.
4. *Fredericq E.* Study of the Interaction of DNA and Acridine Orange by Various Optical Methods / E. Fredericq, C. Houssier // *Biopolymers.* – 1972. – **11**. – P.2281-2308.
5. *Motulsky H.* Analyzing Binding Data / H. Motulsky, R. Neubig // *Curr. Protoc. Neurosci.* [Online], DOI:10.1002/0471142301.ns0705s52, 65p. Available: <http://www.onlinelibrary.wiley.com>
6. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions / G. Scatchard // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1949. – **51**. – P.660-672.
7. *McGhee J.D.* Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice / J. D. McGhee, P. H von Hippel // *J. Mol. Biol.* – 1974. – **86**. – P.469-489.
8. *Nafisi S.* Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. / S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault, H.-A. Tajmir-Riahi // *J. Mol. Struct.* – 2007. – **827**, P.35–43.
9. *Кутувий С. Ю.* Параметри зв'язування алкалоїду сангвінаріну з ДНК / С.Ю.Кутувий, Р.С.Савчук, Н. В. Башмакова // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Сер. Фіз.-мат. науки. – 2014, №3.

Як результат узагальнення результатів цієї та інших наших робіт [1,9], можна зробити висновок про вплив форми ліганду на криву зв'язування. Якщо молекули ліганду плоскі, вони інтеркалюють «більш повно»; відповідно, реалізуються два механізми зв'язування – зовнішнє та інтеркаляція. Якщо частина ліганду знаходиться не в площині молекули, то ця частина, як правило, розміщується в малій борозенці, і тим самим виключає зовнішні місця зв'язування. Відповідно, реалізується єдиний механізм зв'язування – інтеркаляція.

References

1. GUMENIUK, V., BASHMAKOVA, N., KUTOVYY, S. et al. (2011) Binding Parameters of Alkaloids Berberine and Sanguinarine with DNA. *Ukr. J. Phys.* 56. p.524-533.
2. HOUSSIER, C., HARDY, B., FREDERICQ, E. (1974) Interaction of Ethidium Bromide with DNA. Optical and Electrooptical Study. *Biopolymers*, 13, 1141-1160.
3. URBANOVA, J., LUBAL, P., SLANINOVA, I. et al. (2009) Fluorescence properties of selected benzo[c]phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, p.997-1002.
4. FREDERICQ, E. and HOUSSIER, C. (1972) Study of the Interaction of DNA and Acridine Orange by Various Optical Methods. *Biopolymers*, 11, 2281-2308.
5. MOTULSKY, H., NEUBIG, R. (2010) Analyzing Binding Data. *Curr. Protoc. Neurosci.* [Online], DOI: 10.1002/0471142301. ns0705s52, 65 pages. Available:<http://www.onlinelibrary.wiley.com>
6. SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51. p.660-672.
7. MCGHEE, J. and VON HIPPEL, P. (1974) 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.* 86. p.469-489.
8. NAFISI, S., SABOURY, A. A., KERAMAT, N., et al. (2007) Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *J. Mol. Struct.*, 827, p.35–43.
9. KUTOVYY, S., SAVCHUK, R., BASHMAKOVA, N. (2014) Binding parameters of sanguinarine to DNA. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Series Physics and Mathematics*, No.3 (this issue).

Надійшла до редколегії 22.05.2014