

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.32

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДЫ В ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКЕ ДНК**К.М. Вирник, А.И. Гасан, А. В. Шестопалова, В.Я. Малеев***Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12,
Харьков 310085*

Поступила в редакцию 5 мая 1998 г.

В настоящей работе предложен принципиально новый подход к изучению динамических свойств молекул воды, связанных на матрицах биополимеров (нуклеиновых кислот). Он основан на калориметрических измерениях энергии дегидратации систем биополимер-вода при различных уровнях относительной влажности. Обнаружена корреляция между энергией дегидратации и нуклеотидным составом природной ДНК. Из экспериментальных данных были рассчитаны некоторые динамические характеристики молекул воды в гидратных оболочках изученных биополимеров. Кроме того, методом Монте-Карло были изучены системы, содержащие динуклеотиды АрА, ТрТ, УрУ и водные кластеры различных размеров (20, 40 и 200 молекул воды). Результаты монтекарловского моделирования коррелируют с соответствующими данными калориметрических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, калориметрия, моделирование Монте-Карло, энергетика, динамические свойства

Вода является неотъемлемым элементом структуры ДНК, принимающим участие в формировании и стабилизации ее упорядоченных форм [1-3]. Количественное изменение содержания воды в ДНК вызывает обратимые структурные переходы типа порядок-порядок, порядок-беспорядок [2-5]. Такие структурные перестройки ДНК естественным образом приводят к изменению физических свойств данного биополимера [4]. Кроме того, степень и наблюдаемая картина гидратации ДНК в значительной степени зависят от ее первичной структуры [6-8].

Из всех структурных элементов ДНК вода выделяется своей высокой подвижностью, и такое поведение молекул воды может играть важную роль в иницировании локальных конформационных переходов ДНК [9-11]. В связи с этим возникает большой интерес к изучению энергетических и динамических свойств воды, связанной на матрице ДНК. К настоящему моменту было проведено немало исследований, касающихся проблемы энергетики и динамики системы ДНК-вода [12-24]. В области изучения динамики связанной воды были получены прямые данные о подвижности молекул воды в гидратной оболочке ДНК (время корреляции ядерных спинов протонов, времени диэлектрической релаксации диполей воды) [12-16]. Однако большинство работ в области изучения энергетики системы ДНК-вода в

основном посвящено изучению температурных переходов в этой системе, ее интегральных энергетических характеристик, а также оценке энергетического вклада гидратации в стабилизацию структуры ДНК [17-22], в то время как прямых данных об энергетических характеристиках связанной воды очень мало [4, 23, 24].

Для получения более полной картины, отображающей физико-химические принципы взаимодействия гидратной воды с нуклеиновыми кислотами, очевидно, необходимы дополнительные данные об энергетических и динамических характеристиках молекул связанной воды при различной степени гидратации ДНК. В настоящей работе предлагается новый подход к изучению динамических свойств молекул воды, связанных на матрицах биополимеров. Этот подход основан на калориметрических измерениях энергии гидратации-дегидратации систем нуклеиновая кислота-вода при различных относительных влажностях окружающей среды (ОВ). Параллельно методом Монте-Карло были выполнены предварительные расчеты взаимодействия модельных соединений нуклеиновой природы с водным окружением, результаты которых также представлены в данной работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерения энергии дегидратации систем нуклеиновая кислота-вода были проведены методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии в изотермическом режиме ($T=303\text{K}$). Объектами исследований служили модельные биспиральные полирибонуклеотидные комплексы полиА-полиУ, полиГ-полиС и природная НаДНК тимуса телят (42% GC) (препараты фирмы "Serva", ФРГ). Образцы представляли собой неориентированные волокна. Каждый образец подвергался лиофильной сушке, взвешивался (масса бралась в пределах 10 мг) и увлажнялся до определенного уровня путем выдерживания в течение нескольких суток в атмосфере паров насыщенных водных растворов различных солей, создающих вокруг себя определенную ОВ [25]. Затем образец снова взвешивался и помещался в кювету открытого типа (с отверстием для испарения), после чего кювета с образцом и эталонная кювета (пустая кювета) устанавливались в измерительной камере прибора. Измерения проводились на автоматическом калориметре DSC-101 (фирма "Setaram", Франция).

Были использованы два варианта измерения энергии дегидратации. В первом – образец с заданным содержанием воды помещается в калориметр и в течение определенного времени при заданной температуре регистрируется энергия испарения воды. После этого образец взвешивается и определяется число испарившихся молекул воды, а соответственно и энергия дегидратации в расчете на один моль гидратной воды. Во втором случае – образец, помещенный в калориметрическую систему, подключается к системе с заданной упругостью водяных паров. Такой путь исключает процесс взвешивания образца, тем самым, облегчая эксперимент, поскольку по ранее полученной кривой сорбции можно определить содержание воды в образце. Этим способом в основном и были выполнены экспериментальные исследования. Среднеквадратичное отклонение результатов измерения энергий дегидратации образцов находится в пределах 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены зависимости энергий дегидратации $E(n)$ (n – содержание воды в образце – количество молекул воды на основание, т.е. $\text{Mn}_2\text{O}/\text{MO}$) или так называемые "энергетические спектры" воды, связанной на матрицах полиА-полиУ, полиГ-полиС и НаДНК. Как видно из рисунка, зависимости $E(n)$ для различных

биологических матриц имеют сходное качественное поведение, а именно, с увеличением содержания воды в системах наблюдается монотонное уменьшение энергии дегидратации. Однако при этом наблюдаются количественные различия. Так, кривая зависимости энергии дегидратации $E(n)$ для биспирального полирибонуклеотидного GC-комплекса проходит заметно выше аналогичных кривых в случаях спирали AU-типа и NaДНК. Наблюдаемое отличие показывает, что вода в гидратной оболочке биспирального комплекса полиG-полиC связана более прочными водородными связями, что может быть причиной высокой термостабильности данного комплекса.

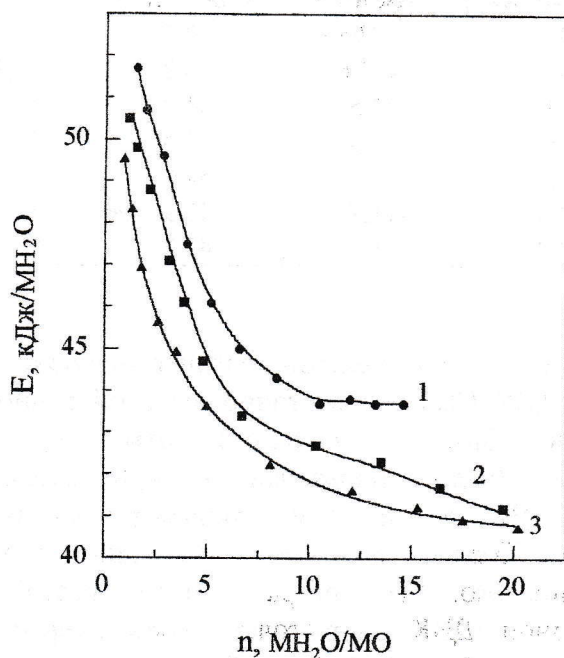


Рисунок 1. Зависимости энергии дегидратации полиG-полиC (1), NaДНК (2) и полиА-полиU (3) от содержания воды в образце.

Кривая зависимости энергии дегидратации от содержания воды для NaДНК проходит между энергетическими кривыми, полученными для чистых AU- и GC-нуклеиновых кислот (рис.1). В связи с этим возникает вопрос о возможной корреляции между энергией дегидратации и нуклеотидным составом нуклеиновых кислот.

В ходе анализа полученных результатов была обнаружена линейная зависимость энергии дегидратации ДНК от нуклеотидного состава, которую можно представить в виде:

$$E^{\text{ДНК}} = X E^{\text{АТ}} + (1-X) E^{\text{GC}}, \quad (1)$$

где X — относительное содержание АТ-пар в структуре ДНК; $E^{\text{АТ}}$, E^{GC} — энергии дегидратации нуклеиновых кислот, состоящих только либо из АТ-, либо из GC-пар соответственно. Параметр X легко определяется по данным “энергетических спектров”, полученным в ходе эксперимента:

$$X = (E^{\text{GC}} - E^{\text{ДНК}}) / (E^{\text{GC}} - E^{\text{АТ}}) \quad (2)$$

Как известно, для тимусной ДНК $A+T/G+C=1,37$, что соответствует содержанию $\sim 58\%$ АТ-пар ($X=0,58$) и $\sim 42\%$ GC-пар. В таб.1 приводятся выборочно взятые из рис.1 значения $E^{ДНК}$, $E^{АТ}$, E^{GC} и параметр X , рассчитанный из уравнения (2), при различном содержании воды (n).

Таблица 1. Значения энергий дегидратации для NaДНК и биспиральных комплексов при различных уровнях гидратации. Относительное содержание АТ-пар в составе NaДНК (X , $X_{ср}$), полученное из уравнения (2).

n , МН ₂ О/МО	$E^{ДНК}$, кДж/МН ₂ О	$E^{АТ}$, кДж/МН ₂ О	E^{GC} , кДж/МН ₂ О	X , %	$X_{ср}$, %
2	49,1	47,8	50,7	55,1	
5	44,7	43,6	46,3	59,3	
7	43,5	42,5	44,8	56,5	
8	43,2	42,3	44,4	57,1	57,4
10	42,8	41,9	44,0	57,1	
12	42,6	41,7	43,9	59,1	
14	42,2	41,1	43,7	57,7	

Найденное по "энергетическим спектрам" среднее значение содержания АТ-пар в структуре природной ДНК ($X_{ср}$) с достаточно высокой точностью совпадает со справочными данными. Здесь необходимо отметить, что в качестве "калибровочных" образцов были использованы полирибонуклеотиды, в то время как в природных ДНК в качестве мономерных звеньев выступают дезоксирибонуклеотиды. Однако этот факт, очевидно, если и повлиял на результаты, то незначительно. Таким образом, чтобы рассчитать нуклеотидный состав данной природной ДНК, достаточно иметь энергетическую изотерму гидратации $E(n)$ интересующей нас ДНК и подобные зависимости для полиА-полиU и полиG-полиС. И наоборот, зная нуклеотидный состав природной ДНК и энергетические изотермы гидратации полинуклеотидов можно рассчитать "энергетический спектр" интересующей нас ДНК.

С использованием полученных зависимостей энергий дегидратации $E(n)$ были получены некоторые характеристики динамической подвижности связанной воды на матрицах ДНК и модельных полирибонуклеотидов. Одним из таких параметров, характеризующим подвижность молекул связанной воды, является время дипольной релаксации молекул связанной воды τ_d , а вторым – "свободный объем" V_f , занимаемый молекулами воды в гидратной оболочке.

Информация о зависимости τ_d от содержания воды в образце n была получена из уравнения, связывающего время дипольной релаксации с избыточной энергией гидратации $\Delta E(n)$:

$$\tau_d = \tau_d^0 \exp(\Delta E(n)/RT), \quad (3)$$

где τ_d^0 - значение время дипольной релаксации для чистой воды при комнатной температуре равно $0,9 \cdot 10^{-11}$ с; T - температура в Кельвинах; R - газовая постоянная; $\Delta E(n) = E(n) - E_0$, $E_0 = 40,5$ кДж/МН₂О - средняя энергия взаимодействия вода-вода в объемной фазе.

На рис.2 представлены кривые, отвечающие зависимостям $\tau_d(n)$ для данных образцов. Эти кривые так же, как и кривые $E(n)$ имеют качественно похожий вид, но количественно различаются. Из рисунка видно, что на начальных стадиях гидратации ($n < 6$) значения τ_d быстро убывают (уменьшаются приблизительно на порядок), а при дальнейшем увеличении n постепенно приближаются к значению τ_d^0 для чистой воды. Этот результат согласуется с данными, которые показывают неразличимость физических свойств периферийной воды от свойств объемной воды [2, 4]. В пределах рассматриваемого интервала ОВ (5-95% ОВ) время релаксации изменяется примерно на 2 порядка. Также как и по "энергетическим спектрам", из рис.2 видно, что молекулы воды во всем интервале ОВ наиболее сильно связаны с матрицей полиГ-полиС и слабее всего с матрицей полиА-полиУ.

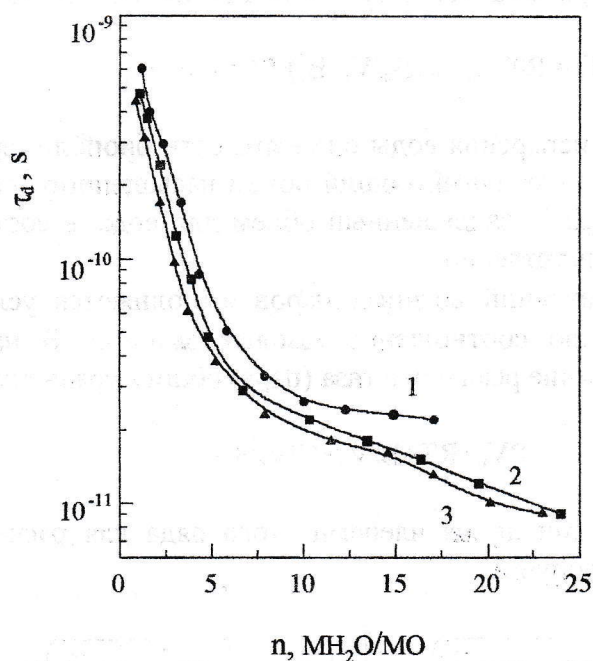


Рисунок 2. Зависимости времени диэлектрической релаксации диполей воды τ_d от содержания воды n для полиГ-полиС (1), НаДНК (2) и полиА-полиУ (3)

Другим физическим параметром, который был рассчитан из полученных зависимостей $E(n)$, является свободный объем V_f . Понятие "свободного объема" появляется в связи с рассмотрением эффектов внутреннего структурного устройства жидкости (молекулы которой имеют способность участвовать в водородном связывании), так как реорганизация структуры такой жидкости прямо не отражается в изменениях общего объема [26].

Общий удельный объем воды можно представить в виде суммы "занятого" (V_o) и "свободного объемов" [27]. "Занятый объем" состоит из кластеров связанных молекул воды, которые участвуют в водородном связывании, образуя от одной до четырех водородных связей, оставляя несвязанные молекулы воды в качестве "свободного объема". Необходимо подчеркнуть, что объем несвязанных молекул воды, интерпретируемый как "свободный", не является тем же самым, что и

истинный свободный объем, т.е. пустое пространство, связанное с каждой молекулой.

Таким образом, в случае рассматриваемой системы нуклеиновая кислота-вода такой параметр, как "свободный объем" определяет характер молекулярных сил связывания молекул воды с адсорбционными центрами донорного и акцепторного типов, а также возникновение на биополимерных матрицах регулярно упорядоченных структур молекул воды. Чем сильнее связывание или стабильнее кооперативно-организованная структура гидратной оболочки, тем меньше "свободный объем", занимаемый молекулами воды.

"Свободный объем" V_f определяется как разность между общим объемом, занимаемым гидратной оболочкой, и запрещенным объемом V , зависящим от температуры T , общего объема V и числа молекул N , т.е. $V_f = V - V$. Полная теплота испарения (дегидратации) E в расчете на моль может быть представлена в виде [28]:

$$E = RT \ln(V_{п-В_{п}}/V_{г-В_{г}}) + P(V_{п-В_{п}}) \quad (4)$$

где E – мольная энергия испарения воды с поверхности биополимера; P – давление насыщенного пара; $V_{п}, V_{г}$ – мольный общий объем насыщенного пара и гидратной воды соответственно; $V_{п}, V_{г}$ – запрещенный объем для воды в состоянии пара и в гидратной оболочке соответственно.

В области низких давлений водяных паров выполняются условия $V_{п} \gg V_{п}$ и $V_{г} \gg V_{г}$, тогда справедливо соотношение газовых законов. В настоящее время принято описывать состояние реального газа (пара) общим уравнением в виде ряда:

$$PV_{п} = RT + B/V_{п} + C/V_{п}^2 + \dots \quad (5)$$

Мы воспользуемся первыми двумя членами этого ряда для расчета "свободного объема" $V_f = V_{г-В_{г}}$, тогда получим:

$$\ln V_f = \ln \left[\left(RT + \sqrt{4PB + (RT)^2} \right) / 2P \right] + \left(RT + \sqrt{4PB + (RT)^2} \right) / 2RT - E/RT \quad (6)$$

В этом уравнении имеются две величины, которые измеряются или рассчитываются. Это давление водяных паров в камере (P) и, измеряемая calorиметрически, энергия дегидратации полинуклеотидных матриц или ДНК (E). Давление P в calorиметрической камере рассчитывается из соотношения $P = \phi P_0$, где P – парциальное давление водяного пара в камере при заданной температуре T ; P_0 – упругость насыщенных паров воды при той же температуре. В нашем случае при $T = 303K$ величина $P_0 = 0,0419 \text{ атм.}$, а ϕ – задаваемая ОБ образцов. Параметр V определяется расчетным путем с использованием значения "свободного объема" для чистой воды, который при 303K составляет $\sim 5,4 \text{ см}^3/\text{МН}_2\text{О}$ [26], а энергия испарения при этом равна $40,5 \text{ кДж}/\text{МН}_2\text{О}$.

На рис.3 приведены зависимости "свободного объема" V_f , занимаемого молекулами связанной воды в гидратной оболочке природной NaДНК, полиА-полиU и полиG-полиC от содержания воды, которые были рассчитаны из уравнения (6).

Сравнивая полученные результаты, можно обнаружить существенное отличие в состояниях гидратной воды в различных образцах. "Свободный объем" воды в

гидратной оболочке полиG-полиC оказывается наименьшим во всем интервале ОВ, в то время как для полиА-полиU этот параметр имеет наибольшее значение. Таким образом, можно сделать вывод, что вода в гидратной оболочке полиG-полиC находится в более "стесненном" состоянии, чем в гидратных оболочках NaДНК и полиА-полиU. Данные об объеме, занимаемом парами оснований, и их подвижности в NaДНК, согласно которым подвижность пар оснований увеличивается с увеличением степени гидратации [5, 29], коррелируют с нашими результатами по подвижности связанных молекул воды.

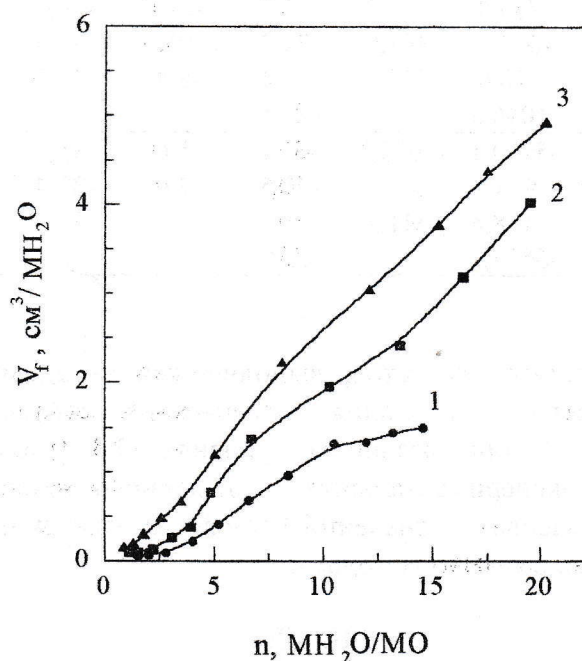


Рисунок 3. Зависимости "свободного объема" V_f в гидратной оболочке полиG-полиC (1), NaДНК (2) и полиА-полиU (3) от содержания воды n

Предварительные расчеты взаимодействия модельных соединений нуклеиновой природы с водным окружением были выполнены методом Монте-Карло. Изученные системы представляют собой водные кластеры различных размеров (20, 40 и 200 молекул воды), содержащие динуклеотиды ApA, UpU и TrT. Такие системы воспроизводят взаимодействие компонентов нуклеиновых кислот с водой при различных уровнях ОВ.

В результате проведенных расчетов были получены энергетические характеристики рассмотренных систем, а именно, полные средние энергии взаимодействия E_{tot} , средние энергии взаимодействия вода-вода E_{ww} , средние энергии взаимодействия динуклеотид-вода E_{dw} , а также удельные средние энергии взаимодействия в системах, приходящиеся на молекулу воды ($E_{ww/1}$, $E_{dw/1}$). На основе этих данных в системах с различным содержанием воды были рассчитаны избыточная энергия гидратации $\Delta E = E_{sum/1} - E_{w/1}$ (где $E_{sum/1} = (E_{ww/1} + E_{dw/1})$, $E_{w/1}$ — средняя удельная энергия взаимодействия вода-вода в чистом водном кластере) и времена дипольной релаксации молекул воды в связанном состоянии τ_d (уравнение (3)). Полученные данные приведены в таб.2.

Таблица 2. Энергетические характеристики систем АрА, УрU, ТрТ в водных кластерах различных размеров и чистых водных кластерах соответствующих размеров

п, МН ₂ O/ МО	система	E _{tot} , кДж/ МН ₂ O	E _{ww} , кДж/ МН ₂ O	E _{dw} , кДж/ МН ₂ O	E _{ww/1} , кДж/ МН ₂ O	E _{dw/1} , кДж/ МН ₂ O	E _{sum/1} , кДж/ МН ₂ O	ΔE, кДж/ МН ₂ O	τ _d · 10 ¹¹ , с
20 H ₂ O	АрА	-925,5	-270,0	-433,9	-13,4	-21,7	-35,1	10,45	61,1
	УрU	-1112,3	-364,9	-264,6	-18,4	-13,4	-31,4	6,7	13,5
	ТрТ	-979,0	-341,5	-252,5	-17,1	-12,5	-29,7	5,0	6,8
	H ₂ O		-439,7		-24,7				
40 H ₂ O	АрА	-1582,6	-780,0	-587,7	-19,7	-14,6	-34,3	8,8	31,3
	УрU	-1836,3	-863,6	-397,9	-21,7	-10,0	-31,4	6,3	10,7
	ТрТ	-1453,0	-728,6	-329,0	-18,4	-8,4	-26,3	1,3	1,7
	H ₂ O		-1046,3		-25,5				
200 H ₂ O	АрА	-7227,6	-5989,1	-1030,8	-30,1	-5,0	-35,1	2,1	1,9
	УрU	-7315,0	-6081,5	-609,0	-30,5	-2,9	-33,4	0,4	1,0
	ТрТ	-7160,8	-6138,8	-641,2	-30,9	-3,3	-33,9	0,8	1,2
	H ₂ O		-6653,7		-33,0				

Сопоставление результатов расчетов, выполненных методом Монте-Карло и данных калориметрического исследования динамических свойств связанной воды на матрицах полиА-полиU при различных уровнях ОБ (рис.2) указывает на корреляцию результатов экспериментального и численного методов, состоящую в достаточно хорошем согласовании значений времени диэлектрической релаксации молекул воды, полученных разными методами.

ВЫВОДЫ

Результаты, полученные в настоящей работе, показали, что энергия дегидратации нуклеиновых кислот (независимо от нуклеотидного состава) уменьшается с ростом содержания воды в образце. Это означает, что энергии связывания молекул воды с матрицей биополимера уменьшаются по мере удаления от гидратно-активных центров. С увеличением содержания GC-пар в составе ДНК энергия дегидратации, а значит и энергия связывания молекул воды, увеличиваются, что проявляется в уменьшении подвижности молекул воды в гидратной оболочке ДНК (параметры τ_d, V_f). Также было установлено, что энергию дегидратации природной ДНК можно представить в виде суммы молярных вкладов энергий дегидратации полинуклеотидов AT(AU)- и GC-типа.

Таким образом, процесс формирования гидратного окружения биополимеров и его динамические свойства могут быть достаточно полно описаны на основе экспериментального (метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии в изотермическом режиме) и расчетного (метод Монте-Карло) подходов. Это представляет собой реальную перспективу для дальнейшего изучения роли водного окружения в процессе стабилизации и осуществлении конформационных переходов в системах ДНК-вода.

Авторы выражают благодарность Государственному фонду фундаментальных исследований за частичную финансовую поддержку данной работы (грант 2.4/759).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edelhoeh H., Osborne J.C. Jr. // *Adv. Protein Chem.* 1976. V.30. P.183-250.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М. Мир, 1987. 584с.
3. Saenger W. // *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1987. V.16. P.93-114.
4. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // *Биофизика.* 1993. Т.38. С.768-790.
5. Lindsay S.M., Lee S.A., Powell J.M., Weidlich T., DeMarko C., Lewen G.D., Tao N.J., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1988. V.27. P.1015-1043.
6. Мревлишвили Г.М. // *ДАН СССР.* 1981. Т.260. С.761-764.
7. Vovelle F., Goodfellow J.M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1990. V.12. P.369-373.
8. Schneider B., Cohen D., Berman H.M. // *Biopolymers.* 1992. V.32. P.725-750.
9. Andreasson B., Nordenskiöld L., Eriksson D.-O., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1994. V.34. P.1605-1614.
10. Lahajnar G., Zupancic I., Rupprecht A. In *Biophysics of Water* (Franks, F. & Mathias, S., eds). Wiley, New York, 1982. P.231-234.
11. Kim U.-S., Fujimoto B.S., Furlong C.E., Sundstrom J.A., Humbert R., Teller D.C., Schurr J.M. // *Biopolymers.* 1993. V.33. P.1725-1745.
12. Sprinz H., Döllstödt R., Hübner G. // *Biopolymers.* 1969. V.7 P.447-452.
13. Dahlborg U., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1971. V.10. P.849-863.
14. Liepinsh E., Otting G., Wüthrich K. // *Nucleic Acids Res.* 1992. V.20. P.6549-6553.
15. Langan P., Forsyth V.T., Mahendrasingam A., Pigram W.J., Mason S.A., Fuller W. // *J. Biomol. Struc. and Dyn.* 1992. V.10. P.489-503.
16. Jacobson A., Leupin W., Liepinsh E., Otting G. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V.24. P.2911-2918.
17. Семенов М.А., Малеев В.Я., Сухоруков Б.И. // *Биофизика.* 1978. Т.23. С.1097-1098.
18. Семенов М.А., Больбух Т.В. // *Биофизика.* 1984. Т.29. С.377-382.
19. Семенов М.А., Малеев В.Я. // *Биофизика.* 1986. Т.31. С.764-767.
20. Semenov M.A., Starikov E.B., Bolbukh T.V. // *Stud. Biophys.* 1988. V.123. P.217-224.
21. Gasan A.I., Maleev V.Ya., Semenov M.A. // *Studia Biophys.* 1990. V.130. P.171-178.
22. Wu J.Q., Macgregor R.B. Jr. // *Biopolymers.* 1995. V.35. P.369-376.
23. Семенов М.А., Гасан А.И., Больбух Т.В., Малеев В.Я. // *Биофизика.* 1996. Т.41. С.1007-1015.
24. Marlowe R.L., Lukan A.M., Lee S.A., Anthony L., Chandrasekaran R., Rupprecht A. // *J. Biomol. Struc. and Dyn.* 1996. V.14. P.373-379.
25. Воронец Д., Козич Д. Влажный воздух: термодинамические свойства и применение. М. Энергоатомиздат, 1984. 135с.
26. Miller A.A. // *J. Chem. Phys.* 1963. V.38. P.1568-1571.
27. Némethy G., Scheraga H.A. // *J. Chem. Phys.* 1962. V.36. P.3382-3387.
28. Мэлвин-Хьюз Э.А. Физическая химия. Т.2. М.Изд-во Иностран. лит., 1962. 266с.
29. Brandes R., Vold R.R., Kearns D.R., Rupprecht A. // *J. Mol. Biol.* 1988. V.202. P.321-332.