

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том IV

СОЕДИНЕНИЯ

№ 1

1962

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

I. МОЛЕКУЛЯРНАЯ МОРФОЛОГИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

*А. М. Тонгур, А. Л. Зайдес, И. Г. Стоянова,
А. Г. Пасынский*

Существующие методы выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из тканей основаны на извлечении нуклеопротеидов при помощи 0,13—0,14 M NaCl с последующим отделением белка от нуклеопротеида.

Для отделения белка применяют обработку солевого раствора нуклеопротеида смесью спирта и хлороформа [1—3], высаливанием [4—5] и насыщенным водным раствором фенола [6—7]; иногда гомогенаты тканей непосредственно обрабатывают растворами детергентов [8—9].

Исследования светорассеяния, седиментации в ультрацентрифуге и вязкости препаратов ДНК, полученных различными методами, показали, что молекулы ДНК представляют собой палочкообразные частицы, с константной седиментацией 25 S, сохраняющие свои биологически специфичные свойства [10—17]. Исследования в электронном микроскопе препаратов ДНК, полученных с применением растворов спирта—хлороформа, детергентов или методом высаливания, показали, что диаметр единичных вытянутых молекул составляет около 20 Å, но форма изолированных молекул колебалась от фибриллярной до свернутой [10, 14, 17—23].

Свернутая или глобулярная форма молекул ДНК наблюдалась при щелочной или температурной денатурации ДНК, а также при изменении концентрации соли в растворе [10, 18—20].

По-видимому, причиной появления свернутых или глобулярных форм молекул ДНК является разрыв водородных связей при денатурации, приводящий к нарушению нативной конформации ДНК.

Фенольный метод получения ДНК дает препараты с высоким молекулярным весом и вследствие этого широко применяется в настоящее время в научных исследованиях. Между тем препараты, полученные этим методом, до сих пор не исследовались в электронном микроскопе.

Ввиду того что фенол способен разрывать водородные связи в молекулах белков и нуклеиновых кислот, представлялось возможным изменение морфологии молекул ДНК, полученных этим методом.

Кроме того, представляло интерес применить к исследованию ДНК новые методы электронной микроскопии, позволяющие изучать препараты во влажном состоянии, чтобы избежать их интенсивной сушки.

Экспериментальная часть

Методика исследования. Растворы нуклеопротеидов, извлеченных из гомогената тимуса телят при помощи 0,14 M NaCl, многократно (18—20 раз) обрабатывали смесью хлороформа с *n*-бутанолом (3 : 1) с разделением получающейся эмульсии на центрифуге [1, 3]. Кроме того, ДНК выделялась по фенольному методу [7]. Образцы ДНК, выделенные по обоим методам, переосаждали в спирте и дialisировали против 0,14 M NaCl.

Характеристики полученных препаратов приведены в таблице. Диализованные препараты ДНК разбавляли водой при 2—3° до концентрации 2—5 γ/мл. Нанесение образцов на объектодержатель электронного микроскопа и сушку в вакуум-эксикаторе производили также при 2—3°. Для увеличения контраста высушенные объекты оттенялись хромом под углом 15°. Измерения сухих объектов производили в электронном микроскопе УЭМ-100. Часть измерений была произведена в специальном электронном

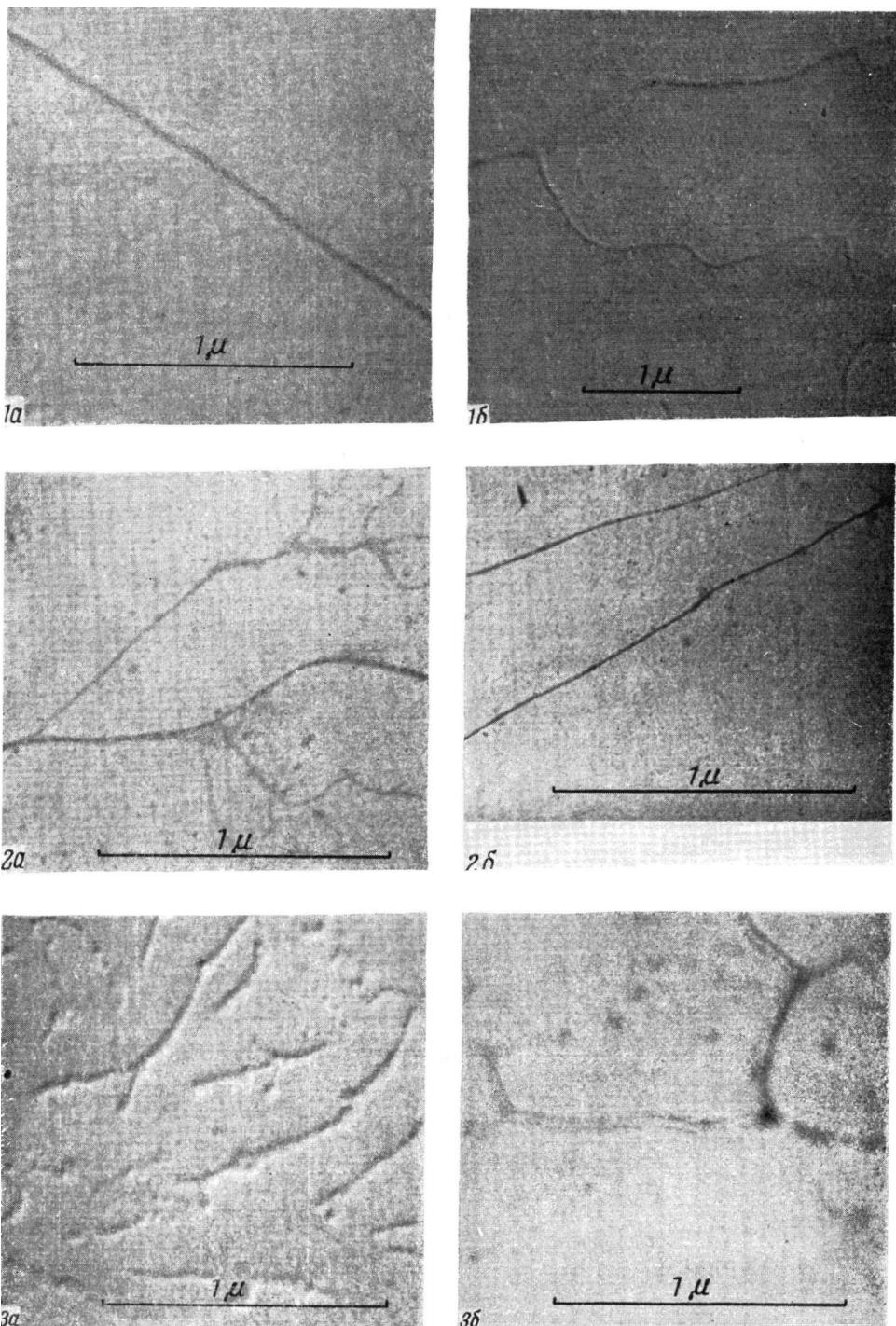


Рис. 1, а, б. Форма молекул ДНК, полученной по методу Мирского и Поллистера (снято в сухом состоянии)

Рис. 2, а, б. Форма молекул и фибрилл ДНК, снятых во влажном состоянии (ср. с рис. 1, а, б)

Рис. 3. Форма фибрилл ДНК, полученной по фенольному методу
а — снято в сухом состоянии (ср. с рис. 1, б); б — снято во влажном состоянии (ср. с рис. 2, б)

микроскопе, позволяющем производить наблюдения объектов во влажном состоянии без их высушивания. Конструкция электронного микроскопа и методика исследования влажных объектов были описаны в [26].

Результаты измерений и обсуждение

Исследования в электронном микроскопе показали, что молекулы ДНК, полученной по методу Мирского и Поллистера, представляют собой вытянутые нитевидные образования (рис. 1, а) в согласии с результатами, полученными для других препаратов ДНК [15—20]. На рис. 1, б видно, что эти нитевидные образования в некоторых местах соединяются (агрегируют) в более толстые фибрillы, которые, однако, также имеют линейную конформацию.

Интересно, что аналогичные результаты наблюдаются и для препаратов ДНК, находящихся в растворе (рис. 2, а). В нижней части рис. 2, а видны тонкие нити отдельных молекул ДНК, а в средней части видно сцепление этих нитей в более толстые фибрillы. Эта фотография, которая впервые показывает форму нативных молекул ДНК во влажном состоянии, сравнительно мало отличается от фотографий сухих препаратов (рис. 1 а, б).

Сопоставление рис. 2, а и рис. 1, а и б приводит к существенному выводу, что высушивание препарата не приводит к принципиальному изменению конформации нативной ДНК. В других образцах во влажном состоянии (рис. 2, б) также наблюдались ровные нити ДНК, без заметного их разветвления. По данным Инмена и Джордана [17] и ряда других авторов [24], денатурация ДНК различными методами приводит к появлению свернутых структур глобулярной формы. Отсутствие таких структур на рис. 1—2 указывает на низкую степень денатурации при получении исследованных образцов.

Конформация частиц ДНК, полученных фенольным методом, значительно отличается от ранее описанных препаратов. Из рис. 3, а видно, что фенольные препараты ДНК содержат преимущественно короткие и толстые фибрillы со значительной разветвленностью и наличием большого количества глобулярных утолщений, которые, по-видимому, являются результатом денатурации под действием фенола в процессе выделения ДНК. Аналогичная картина наблюдается для фенольных препаратов ДНК, снятых во влажном состоянии (рис. 3, б). При такой конформации частиц растворы препаратов ДНК, полученных по фенольному методу, могут обладать более высокой вязкостью и гидродинамическим сопротивлением при седиментации, чем простые нитевидные частицы, что может вызывать заметные отклонения величины вычисляемых молекулярных весов от истинных значений. Несмотря на сохранение биологической активности [15], препараты ДНК, полученные по фенольному методу, несомненно обнаруживают значительные структурные отклонения от препаратов, полученных по методу Мирского и Поллистера. Наши измерения показали, что предельная приведенная вязкость $[\eta]$ препаратов ДНК в фенольном растворе возрастает по мере увеличения концентрации фенола в растворе (рис. 4).

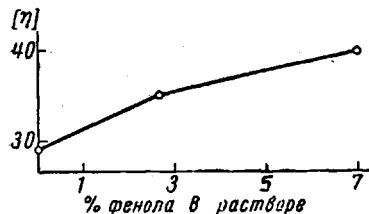


Рис. 4. Зависимость $[\eta]$ ДНК в фенольном растворе от концентрации фенола

Характеристика исследуемых препаратов ДНК

Метод получения ДНК	Молекулярный вес, измеренный вискозиметрическим методом [25]	Соотношение N/P
Спирто-хлороформенный (по Мирскому-Поллистеру)	$4,6 \cdot 10^6$	1,76
То же	$5,0 \cdot 10^6$	1,8
» »	$4,0 \cdot 10^6$	1,67
Фенольный (по Георгиеву)	$7,0 \cdot 10^6$	1,76

Этот результат можно объяснить, с одной стороны, выпрямлением молекул ДНК при частичном разрыве водородных связей под действием фенола (этот эффект известен и для денатурации белковых молекул), а с другой стороны, повышением сорбции фенола частицами ДНК при повышении концентрации фенола в растворе; оба эффекта могут приводить к увеличению $[\eta]$ частиц ДНК. Таким образом, несомненно, что воздействие фенола приводит к существенным структурным изменениям в частицах ДНК, которые должны учитываться при различных исследованиях с этими препаратами.

Выводы

Исследования в электронном микроскопе препаратов ДНК, полученных по методу Мирского и Поллистера, показывают преобладание в них линейных нитевидных частиц. Методом электронной микроскопии во влажном состоянии показано, что частицы ДНК обладают аналогичной конформацией и в растворе. Показано, что фенольный метод выделения ДНК вызывает существенные структурные изменения в ее частицах.

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР
ЦНИИ кожевенной промышленности

Поступила в редакцию
23 V 1961

ЛИТЕРАТУРА

1. A. E. Mirsky, A. Pollister, J. Gen. Physiol., 30, 117, 1947.
2. J. M. Gulland, D. O. Jordan, C. Threlfall, J. Chem. Soc., 1947, 1129.
3. M. G. Savag, D. B. Lacman, J. Smollens, J. Biol. Chem., 124, 425, 1938.
4. R. Singer, H. Schwander, Helv. Chim. Acta, 32, 853, 1949.
5. B. Taylor, J. P. Greenstein, A. Hollaender, Arch. Biochem., 16, 19, 1948.
6. K. S. Kurbu, Biochem. J., 66, 495, 1957.
7. Г. П. Георгиев, Биохимия, 24, 472, 1959.
8. E. R. M. Kay, N. S. Simmons, A. L. Dounce, J. Amer. Chem. Soc., 74, 1724, 1952.
9. N. S. Simmons, S. Chavos, K. Orbach, Feder. Proc., 11, 390, 1952.
10. P. Doty, J. Marmur, I. Eigner, Schild-Kraut, Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 461, 1960.
11. K. S. Kurbu, Biochem. J., 70, 260, 1958.
12. A. Kleinschmidt, R. K. Zahn, Z. Naturforsch., 14b, 770, 1959.
13. K. V. Shooter, I. A. V. Butler, Trans. Faraday Soc., 52, 734, 1956.
14. M. Reichman, S. Rice, C. Thomas, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 76, 3047, 1954.
15. O. O. DiMayorca, B. E. Eddy a. oth., Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 1805, 1959.
16. H. Kahler, B. J. Lloyd, Bioch. Biophys. Acta, 10, 355, 1953.
17. R. Inman, D. Jordan, Bioch. Biophys. Acta, 43, 202, 1960.
18. S. N. Chatterjee, P. Sadhukhan, Naturwiss., 47, 131, 1960.
19. R. Vendrely, C. Venrely, C. Sadron, Exp. Cell. Res., 15, 222, 1958.
20. C. Hall, Proc. IV. Intern. Congr. Biochem. Sympos., 9, 94, 1959.
21. H. Schuster, G. Schramm, W. Zill, Z. Naturforsch., 11b, 339, 1956.
22. S. Bayley, Nature, 168, 470, 1951.
23. J. Liquir-Millard, Bioch. Biophys. Acta, 10, 5, 1953.
24. J. Butler, Radiation Res., suppl., 1, 403, 1950.
25. Д. М. Спятковский, Биофизика, 1, 319, 1953.
26. И. Г. Стоянова, Г. А. Михайловский, Биофизика, 4, 483, 1959.

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF DNA.

I. MOLECULAR MORPHOLOGY OF VARIOUSLY ISOLATED DNA SPECIMENS

A. M. Tongur, A. L. Zaides, I. G. Stoyanova, A. G. Pasynskii

Summary

Electron microscopic studies by Mirsky and Pollister's method of DNA specimens showed the latter to consist mainly of linear fibrous particles. Electron microscopic studies of wet specimens revealed that the particles have an analogous configuration in solution. The phenol method for the isolation of DNA causes important structural changes in its particles.