

**ДИНАМИЧЕСКОЕ ДВОЙНОЕ ЛУЧЕПРЕЛОМЛЕНИЕ В РАСТВОРАХ
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

**I. ОПТИЧЕСКАЯ АНИЗОТРОПИЯ МОЛЕКУЛЫ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ
КИСЛОТЫ В НАТИВНОМ И АГРЕГИРОВАННОМ ДЕНАТУРИРОВАННОМ
СОСТОЯНИЯХ**

**Э. В. Фрисман, В. И. Воробьев, Л. В. Щагина,
Н. К. Яновская**

Биологическая роль дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) как универсального носителя наследственной информации у живых организмов привлекло внимание широкого круга исследователей к изучению этого вещества. Последние несколько лет ознаменовались выдающимися успехами в изучении структуры, физико-химических свойств и биологической функции ДНК.

ДНК представляет собой линейный полимер, построенный из основных мономерных единиц — нуклеотидов. Каждый из нуклеотидов является сложной молекулой, состоящей из гетероциклического азотистого основания, остатка дезоксирибозы и фосфатной группы. ДНК содержит четыре типа оснований: два пуриновых — аденин и гуанин и два пиримидиновых — цитозин и тимин. Нуклеотиды связаны в ДНК через фосфатные группы, соединяющие третий и четвертый углеродные атомы соседних углеводных остатков.

В 1953 году Уотсоном и Криком [1, 2] была создана молекулярная модель ДНК на основании данных рентгеноструктурного анализа [3]. Было показано, что макромолекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, соединенных водородными связями между азотистыми основаниями в виде двойной спирали с фосфатными группами, обращенными наружу, и основаниями, расположеннымными перпендикулярно оси спирали. Многочисленные исследования [4, 5] показали, что макромолекула ДНК сохраняет спиральную структуру в растворах.

Водородные связи между единочными цепями ДНК могут образоваться только между тимином и аденином и цитозином и гуанином [2]. Таким образом, последовательность нуклеотидов в одной цепи оказывается заданной последовательностью нуклеотидов другой комплементарной цепи. Именно определенная последовательность нуклеотидов в цепи ДНК определяет специфичность ДНК и ее биологические свойства как носителя наследственной информации. Структура в виде двойной спирали обеспечивает возможность передачи информации при редупликации ДНК.

При действии различных внешних факторов происходит изменение структуры ДНК, сопровождающее потерю ее биологической активности, — денатурация. Обнаружено, что денатурация ДНК связана с разрушением двойной спирали [6, 9].

Наиболее полно изучалась тепловая денатурация ДНК. При этом использовались различные оптические и гидродинамические методы исследования: светорассеяние, оптическая активность, измерение поглощения в ультрафиолетовой области, дихроизм в ультрафиолетовой области, вязкость, определение константы седиментации, ультрапентрифугирование в градиенте плотности [7—12] и др. Различными методами установлено, что денатурация ДНК происходит в сравнительно узком температурном интервале. При этом макромолекула переходит из двусpirальной конформации в состояние статистического клубка. Этот переход, обусловленный нарушением упорядоченной вторичной структуры ДНК, называют внутримолекулярным плавлением. Поскольку в ДНК осуществляются два типа соединений полинуклеотидных цепей (аденин-тимин и гуанин-цитозин), значительно отличающихся по суммарной энергии связей, температура перехода спираль — клубок зависит от состава ДНК [6]. В то же время ширина области перехода зависит от степени гомогенности: ДНК фага обнаруживает резкий температурный переход, в то время как ДНК из животных тканей, содержащая богатую информацию, заключенную в не менее чем 10^5 сортов макромолекул, дает более растянутую зону тепловой денатурации [6].

Несмотря на интенсивное исследование денатурации ДНК, этот процесс во многом остается неясным, и всестороннее изучение его все еще является одной из важнейших задач физической химии ДНК.

Понимание механизма денатурации, в особенности первого этапа ее — разделения цепей, существенно еще и потому, что редупликация ДНК, как это было показано Мезельсоном [9], также связана с разделением двойной спирали.

Было бы весьма важно использовать при изучении денатурации, в особенности ее начальных этапов, метод исследования, чувствительный к весьма незначительным структурным изменениям макромолекулы. Таким методом является метод динамического двойного лучепреломления. Это и побудило нас начать исследование динамического двойного лучепреломления растворов ДНК.

Существует ряд работ, посвященных изучению двойного лучепреломления в потоке растворов ДНК [12—19]. Однако наиболее ранние из них носят лишь качественный характер. Кроме того, в большинстве работ изучалась только ориентация двойного лучепреломления, связанная в основном с гидродинамическими параметрами макромолекулы. Количественное исследование величины и ориентации двойного лучепреломления растворов ДНК проведено в работе Перея [18], но изучены лишь растворы, содержащие ДНК в нативном состоянии.

Образец и метод измерения

В работе использовали натриевую соль ДНК, полученную из зобной железы теленка путем предварительного выделения дезоксирибонуклеопротеида по методу Мирского [20] с последующей депротеинизацией по Кэрби [21]. Препарат содержал 12,63% N и 7,37% P. Отношение азота к фосфору N/P = 1,71 показывает, что в препарате содержались лишь незначительные примеси белка. Низкие значения N и P по сравнению с теоретическими связаны с примесью солей в препарате. Величина атомного коэффициента экстинкции $E(p) = 6500$ указывает на нативность исследуемого образца. Растворителем служил 0,15 M раствор NaCl. Образец растворяли непосредственно в указанном растворителе. Для измерения величины и ориентации двойного лучепреломления использовали оптическую установку с полутеневым компенсатором, описанную ранее [22]. Компенсатором служила слюдяная пластина 0,0232 λ .

Исследования проводили в приборе с внутренним ротором. Ввиду огромного различия в величине двойного лучепреломления растворов нативной и денатурированной ДНК использовали два ротора, дающих следующие зазоры: $\Delta r = 0,06 \text{ см}$ и $\Delta r_2 = 0,167 \text{ см}$. Радиус ротора $r = 1,6 \text{ см}$. Зазоры измеряли микроскопом и градуировали по известной жидкости. Корреляция зазоров осуществлялась измерением величины двойного лучепреломления одного раствора при использовании двух роторов. Длина ротора $l = 3 \text{ см}$. Измерения проводили в условиях ламинарности потока. Относительные вязкости растворов определяли в вискозиметре типа Оствальда. Все исследования проведены при 21° .

Данные опыта

Изучали зависимость величины Δn и ориентации a двойного лучепреломления от градиента скорости g для растворов ДНК. Исходная концентрация натриевой соли ДНК составляла $c = 0,0155 \text{ г}/100 \text{ мл}$. Исследовали растворы нативной ДНК и прогретые в водяном термостате при 80, 90, 100°, поскольку, согласно Доти [7], нагревание растворов ДНК до 80° не вызывает каких-либо заметных изменений. Время нагревания — 20 мин. После нагревания растворы быстро охлаждали при 0°. Нагреванию подвергали лишь исходный раствор, который затем последовательно разбавляли.

Очевидно, мы получали растворы агрегированной денатурированной ДНК, так как охлаждению подвергались растворы сравнительно высокой концентрации ДНК и большой ионной силы [6]. Влияние измерения двойного лучепреломления на растворы контролировали путем исследования их поглощения при $\lambda = 260 \text{ } MM\kappa$ до и после опыта. Растворы не обнаружили заметного изменения поглощения.

Было проведено несколько серий измерений. В качестве примера мы приводим зависимость величины Δn от g для одного раствора при различных концентрациях (рис. 1). Графики показывают, что в изученной нами области градиентов скоростей и концентраций Δn отрицательно и возвращает пропорционально g . Подобная зависимость $\Delta n = f(g)$ наблюдается для всех исследованных растворов.

На рис. 2, а приведена зависимость $(\Delta n/gc\eta_0)_{g \rightarrow 0} = f(c)$, где η_0 — вязкость растворителя, позволяющая определить динамооптические постоянные $[n]$ для растворов одной серии измерений. Для этих же растворов получены значения характеристических вязкостей $[\eta]$ из рис. 2, б.

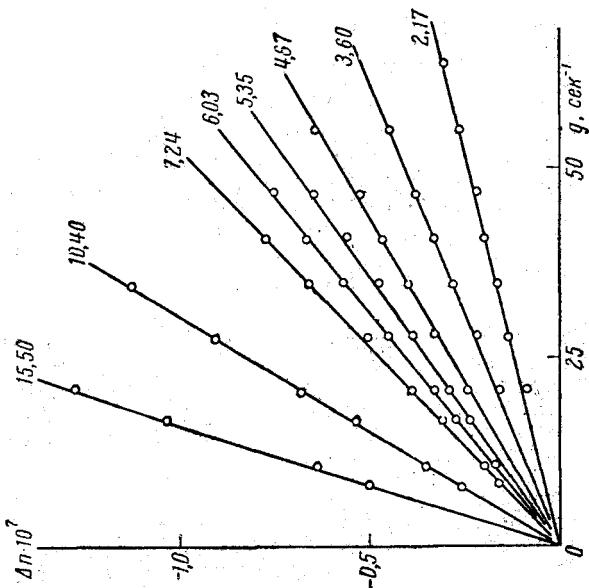


Рис. 1. Зависимость Δn от g для растворов нативной ДНК разных концентраций

Цифры у кривых указывают концентрацию раствора в $g/\text{мл} \cdot 10^6$

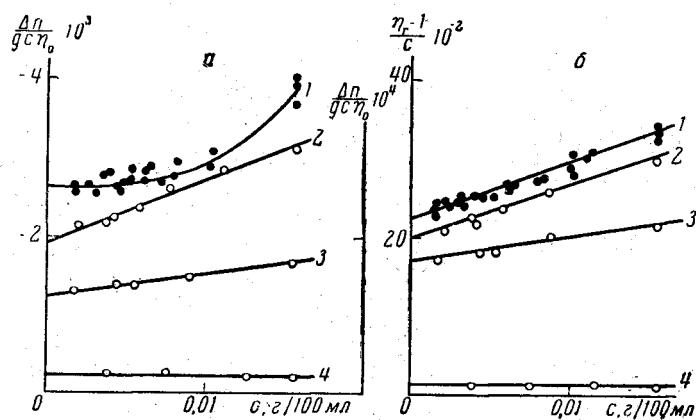


Рис. 2. Зависимость величины $\Delta n/gc\eta_0$ (а) и $(\eta_r - 1)/c$ (б) от c для растворов: 1 — нативной ДНК (трех серий измерений); 2, 3 и 4 — прогретых 20 мин. при 80, 90 и 100° соответственно

Правый масштаб на оси ординат рис. а — для кривой (деления соответствуют левой оси)

Экспериментальные данные показывают, что в растворах нативной и агрегированной денатурированной ДНК (прогретой при 100°) величина $[n]$ изменяется в 115 раз, а $[\eta]$ — в 16 раз.

Обсуждение результатов

Известно, что характеристические значения величины двойного лучепреломления и вязкости позволяют определить оптическую анизотропию макромолекулы [23]:

$$\frac{[n]}{[\eta]} \frac{27 n_s kT}{4\pi (n_s^2 + 2)^2} = \theta_i + \theta_f. \quad (1)$$

Здесь n_s — показатель преломления растворителя, θ_i — собственная анизотропия макромолекулы, θ_f — анизотропия, обусловленная асимметрией молекулярного клубка (анизотропия формы). Для растворов конечной концентрации уравнение (1) принимает вид [24, 25]:

$$\frac{\Delta n}{g\eta_0 (\eta_r - 1)} \frac{27 n_s kT}{4\pi (n_s^2 + 2)^2} = \theta_f + \theta_f^*, \quad (2)$$

где θ_f^* — анизотропия формы при данной концентрации раствора, η_r — относительная вязкость раствора, η_0 — вязкость растворителя. При отрицательном значении θ_i знак результирующей анизотропии зависит от соотношения величины θ_i и θ_f^* . Возрастание концентрации приводит к уменьшению θ_f и в предельном случае очень больших концентраций $\theta_i + \theta_f^* \rightarrow \theta_i$ [26, 27]. Таким образом, с ростом концентрации рас-

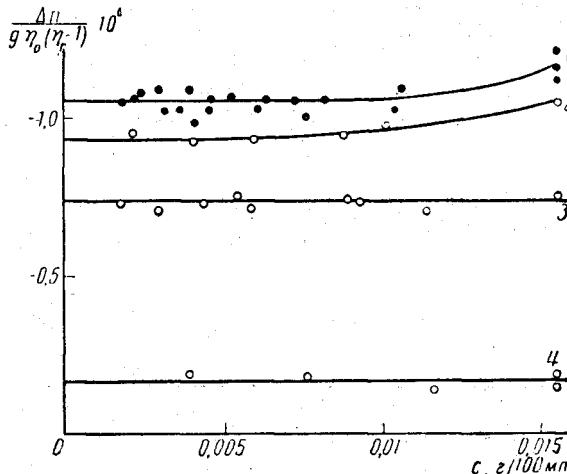


Рис. 3. Зависимость величины $\Delta n/(g\eta_0 (\eta_r - 1))$ от c для растворов: 1 — нативной ДНК; 2, 3 и 4 — прогретых 20 мин. при 80, 90 и 100° соответственно

твora величина $\Delta n/(g\eta_0 (\eta_r - 1))$ уменьшается, т. е. в случае ее отрицательного значения возрастает по абсолютной величине. В системах же, где эффект формы отсутствует ($n_k = n_s$) [23], $\theta_f = 0$ и $\Delta n/(g\eta_0 (\eta_r - 1))$ не зависит от концентрации раствора.

Пользуясь приведенными уравнениями, рассмотрим экспериментальные данные, полученные для растворов ДНК.

На рис. 3 дана зависимость $\Delta n/(g\eta_0 (\eta_r - 1)) = f(c)$ для изученных нами растворов одной серии измерений. Растворы, прогретые при 90 и 100°, дали прямые, параллельные оси концентраций. Графики, полученные для растворов нативной ДНК и прогретых при 80°, имеют некоторую тенденцию к искривлению.

Вид рис. 3 создает впечатление, что, несмотря на большое значение $[n_k - n_s]$, в растворах, прогретых при 90 и 100°, эффект формы вообще

не играет роли и играет весьма малую роль в растворах нативной ДНК и прогретых при 80° . При этих условиях $\theta_f = 0$. Значения θ_i , вычисленные по уравнению (1), которое в этом случае эквивалентно (2), приведены в таблице.

Анизотропия, полученная для молекул ДНК, на несколько порядков выше, чем анизотропия, получаемая даже для весьма анизотропных макромолекул. Если эффект формы в этой системе играет существенную роль, то учет его привел бы к еще большему значению θ_i . Такая большая анизотропия может иметь место по двум причинам: либо анизотропия мономерного звена очень велика, либо молекула очень жестка.

Пользуясь моделью Уотсона и Крика [1, 2], мы оценили анизотропию мономерного звена. Подсчет показал, что мономерные звенья, содержащие аденин-тимин или гуанин-цитозин, имеют практически одинаковую анизотропию:

$$a_{\parallel} - a_{\perp} = -15 \cdot 10^{-24} \text{ см}^3,$$

которая лишь в 10 раз превосходит анизотропию мономерного звена молекулы полистирола. Таким образом, большое значение θ_i у молекулы ДНК обусловлено ее большой жесткостью. Полагая, что для молекулы ДНК применимо уравнение [28]:

$$\theta_i = \gamma_1 - \gamma_2 = \frac{3}{5} (\alpha_1 - \alpha_2), \quad (3)$$

где $(\alpha_1 - \alpha_2)$ — сегментная анизотропия, можно вычислить число мономерных звеньев в сегменте $S = (\alpha_1 - \alpha_2) / (a_{\parallel} - a_{\perp})$. Значения S , приведенные в таблице, указывают на большую жесткость молекулы ДНК, особенно в нативном состоянии. Пользуясь длиной мономерного звена $b = 3,4 \text{ \AA}$ [1, 2], мы определили длину сегмента по Куну $A_m = S \cdot b$ (таблица).

Геометрические и оптические параметры молекулы ДНК в нативном и денатурированном состоянии

Исследованные растворы ДНК	$\theta_i \cdot 10^{20}$ см ³	$(\alpha_1 - \alpha_2) \times 10^{20}$ см ³	S	$A_m \cdot \text{\AA}$	$A_m, \text{\AA}$ по уравнению (4)	$\sqrt{R^2}, \text{\AA}$ по уравнению (5)
Непрогретые	-0,90	-1,5	1000	3400	1030	~5000
Прогретые при 80°	-0,87	-1,3	900	3060	—	—
Прогретые при 90°	-0,60	-1,0	700	2400	—	—
Прогретые при 100°	-0,12	-0,2	130	440	—	—

Исследование углового распределения интенсивности света, рассеянного растворами нативной ДНК, позволило оценить молекулярный вес образца M и средний радиус инерции нативной молекулы ДНК: $M = 5 \cdot 10^6$, $\sqrt{R^2} = 2 \cdot 10^3 \text{ \AA}$. Это дает нам возможность сравнить величины, полученные из измерений двойного лучепреломления и светорассеяния.

Если воспользоваться червеобразной моделью, введенной в работе [29], то можно определить длину корреляции a по соотношению:

$$\frac{a}{L} \chi(L/a) \cong \frac{3R^2}{L}. \quad (4)$$

Здесь L — гидродинамическая длина цепи; равная $(M/M_0) b$ (M_0 — молекулярный вес мономера = 660), χ — известная функция [30] от L/a .

Данные для L и \bar{R}^2 дают значения $a \approx 5 \cdot 10^2 \text{ \AA}$, что соответствует величине $A_m = 2a \approx 10^3 \text{ \AA}$. Отсутствие сведений о размерах цепи не позволяет нам провести такое сравнение для агрегированных денатурированных молекул ДНК.

Величина A_m , вычисленная по значениям \bar{R}^2 и M , оказалась в 3 раза меньшее, чем полученная из анизотропии. Возможно, это объясняется тем, что при вычислении θ_i (или $a_1 - a_2$) мы пользовались значением $[\eta]$, измеренным при значительном градиенте скорости. Использование $[\eta]_{g=0}$ уменьшило бы $(a_1 - a_2)$ и тем самым величины S и A_m .

Анализ литературных данных [31] показывает, что для нативной ДНК указанного молекулярного веса $[\eta]_{g=0}/[\eta]_g \approx 2$. Учет этого обстоятельства приводит к удовлетворительному совпадению величин A_m , вычисленных из анизотропии и персистентной длины. Следует подчеркнуть, что даже при учете градиентной зависимости $[\eta]$ анизотропия молекулы ДНК сохраняет огромное значение, которое, как указывалось, в основном обусловлено жесткостью цепи.

Величина θ_i , полученная нами для нативной молекулы ДНК, в несколько раз больше, чем в работе Лерея [18]. В некоторой мере это опять таки обусловлено использованием нами величины $[\eta]$, измеренной при конечном значении g . Однако введение $[\eta]_{g=0}$ не могло бы скомпенсировать расхождения в величинах θ_i . Возможно, что для молекул нативной ДНК нельзя пренебречь анизотропией формы. В этом случае для образца, изученного Лереем ($M = 11 \cdot 10^6$), эффект формы должен играть значительно большую роль, чем для исследованного в настоящей работе.

Оценка свернутости нативной молекулы ДНК Q по значениям L и среднеквадратичному расстоянию между концами цепи \bar{h}^2 , определяемому из соотношения

$$\bar{h}^2 = 2a^2 \left(\frac{L}{a} - 1 + e^{-L/a} \right), \quad (5)$$

дает значение $Q = L/\sqrt{\bar{h}^2} \approx 5$, которое, как нам кажется, говорит в пользу высказанного предположения. Правда, учет эффекта формы привел бы к большему расхождению в длинах оптического и геометрического сегмента, но, может быть, при таких условиях понятие сегмента теряет смысл. Полагаем, что более определенное заключение по этому вопросу требует дальнейшего исследования.

Сравнение экспериментального значения оптической анизотропии молекулы ДНК с вычисленной анизотропией мономерного звена несомненно позволяет сделать вывод о чрезвычайно большой жесткости нативной цепи.

В агрегированном денатурированном состоянии жесткость молекулы ДНК хотя несколько и уменьшается, но все же продолжает оставаться очень большой.

В заключение мы приносим свою благодарность Т. М. Бирштейн, Ю. Е. Эйзнеру и О. Б. Птицыну за ценные советы при обсуждении работы.

Выводы

- Изучено динамическое двойное лучепреломление и вязкость в растворах ДНК.
- По экспериментальным данным определена оптическая анизотропия нативной и агрегированной денатурированной молекулы ДНК.
- Согласно модели Уотсона и Крика для молекулы ДНК вычислена разность поляризуемостей мономерного звена.
- Сравнение оптической анизотропии сегмента и мономерного звена позволило сделать вывод об очень большой жесткости молекулы ДНК.

не только в нативном, но и в агрегированном денатурированном состоянии.

5. Произведена оценка свернутости нативной молекулы ДНК.

Физический институт Ленинградского
государственного университета
Институт цитологии АН СССР

Поступила в редакцию
6 VII 1961

ЛИТЕРАТУРА

1. J. D. Watson, F. H. C. Crick, Nature, 171, 964, 1953.
2. F. H. C. Crick, J. D. Watson, Proc. Roy. Soc., London, A223, 80, 1954.
3. M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, Nature, 171, 738, 1953.
4. M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 76, 3047, 1954.
5. P. Doty, J. Cell. Comp. Physiol., 49, 27, 1957.
6. P. Doty, J. Marmur, I. Eigner, C. Schildkrant, Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 461, 1960.
7. S. A. Rice, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 79, 3937, 1957.
8. H. Ehrlich, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 80, 4251, 1958.
9. M. Meselson, F. Stahl, Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671, 1958.
10. P. Doty, H. Boedeker, I. R. Fresco, R. Haselkorn, M. Litt, Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 482, 1959.
11. L. F. Cavalieri, M. Rosoff, B. H. Rosenberg, J. Amer. Chem. Soc., 78, 5239, 1956.
12. H. Schwander, R. Cerf, Helv. chim. acta, 32, 2356, 1949.
13. R. Signer, H. Schwander, Helv. chim. Acta, 32, 853, 1949.
14. H. Schwander, R. Signer, Helv. chim. acta, 34, 1344, 1951.
15. H. Schwander, R. Cerf, Helv. chim. acta, 34, 436, 1951.
16. M. Goldstein, M. E. Reichmann, J. Amer. Chem. Soc., 76, 3337, 1954.
17. M. Joly, J. Polymer Sci., 29, 77, 1958.
18. J. Leray, Theses de Docteur. L'universite de Strasbourg, 1959.
19. P. Horn, J. Leray, J. Pouyet, C. H. Sadron, J. Polymer Sci., 9, 531, 1952.
20. A. E. Mirsky, A. W. Pollister, J. Gen. Physiol., 30, 117, 1946.
21. H. S. Kirby, Biochem. J., 66, 495, 1957.
22. Э. В. Фрисман, В. Н. Цветков, Ж. эксперим. и теор. физ. 23, 690, 1952.
23. В. Н. Цветков, Э. В. Фрисман, Докл. АН СССР, 97, 647, 1954.
24. A. Peterlin, J. Polymer Sci., 12, 45, 1954.
25. Э. В. Фрисман, В. Н. Цветков, J. Polymer Sci., 30, 297, 1958.
26. Э. В. Фрисман, М. А. Сибилева, А. В. Красноперова Высокомолек. соед., 1, 597, 1959.
27. H. Janeschitz-Kriegl, Macromolek. Chem., 33, 55, 1959.
28. W. Kuhn, F. Grün, Kolloid-Z., 101, 248, 1942.
29. O. Kratky, G. Porod, Recueil trav. chim., 68, 1106, 1949.
30. H. Benoit, P. Doty, J. Phys. Chem., 57, 958, 1953.
31. I. Eigner, Doctoral thesis Harvard University, 1960.

FLOW BIREFRINGENCE IN SOLUTIONS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACIDS (DNA).

I. THE OPTICAL ANISOTROPY OF NATIVE AND AGGREGATED DENATURATED DNA

E. V. Frisman, V. I. Vorobev, L. V. Shchagina,
N. K. Yanovskaya

Summary

The optical anisotropy of native and aggregated denatured DNA has been determined from flow birefringence and viscosity measurements. The difference in polarizability of the monomer unit has been calculated on the basis of the Watson and Crick model of the DNA molecule. A comparison of the optical anisotropies of a segment and monomer unit has revealed considerable rigidity not only in native but also in aggregated denatured DNA molecules. An estimate of the degree of coiling in native DNA has shown it to be of low value.