

УДК 678.01:53

**ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
МАКРОМОЛЕКУЛ ПО ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТИ
ИХ РАСТВОРОВ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ**

B. K. Равин

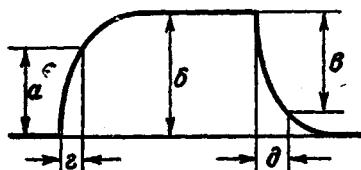
Электрические свойства макромолекул обычно изучаются методом диэлектрических измерений. Однако при применении этого метода к природным полимерам (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) встречаются значительные трудности, обусловленные проводимостью их водных растворов. Проводимость приводит к тому, что измерения диэлектрической постоянной в области 0,1—1,0 мкгц требуют высокой точности аппаратуры, а в области звуковых частот становятся практически невозможными. Этим, по-видимому, объясняется небольшое число работ, посвященных важному для физики природных полимеров вопросу об их электрических свойствах. В особенности это относится к нуклеиновым кислотам.

Сведения о поляризуемости макромолекул, а также об их конформации в растворе можно получить при изучении их ориентации в электрическом поле. Вследствие ориентации макромолекул раствор становится анизотропным. Можно регистрировать анизотропию показателя преломления (эффект Керра) [1], анизотропию поглощения (дихроизм) [2], анизотропию электропроводности [3]. В настоящей работе рассматривается применение последнего метода к природным полимерам.

Для различных форм молекул можно рассчитать изменение электропроводности раствора в электрическом поле. Удобно использовать поле, имеющее форму прямоугольного импульса. Во избежание вредного действия на препарат рекомендуется работать с одиночными импульсами. Характер изменения электропроводности под действием такого поля показан на рис. 1.

Рис. 1. Характер изменения электропроводности раствора макромолекул под действием электрического поля, имеющего форму прямоугольного импульса:

$$\alpha = (1 - e^{-t})\delta(E); \quad \beta = \delta(E); \quad \gamma = (1 - e^{-t})\delta(E); \quad \delta = \tau_D$$



Расчет [4] показывает, что для молекулы формы вытянутого эллипсоида вращения параметры на рис. 1 могут быть вычислены по формулам:

$$\delta(E) = \left(\frac{3}{2} \frac{\int_0^1 x^2 e^{yx^2} dx}{\int_0^1 e^{yx^2} dx} - \frac{1}{3} \right) \delta(\infty) \quad (1)$$

$$\tau_E = 1,68 \frac{kT^3}{\alpha D E^2} (\alpha E^2 \gg kT) \quad (2)$$

$$\tau_D = \frac{1}{6D} \quad (3)$$

$$\gamma = \frac{\alpha E^2}{2kT},$$

где α — поляризуемость молекулы, D — константа вращательной диффузии, которая для вытянутого эллипсоида вращения равна:

$$D = \frac{24 kT}{16\pi L^3 \eta} \left(2 \ln \frac{L}{b} - 1 \right),$$

l — длина, b — диаметр молекулы.

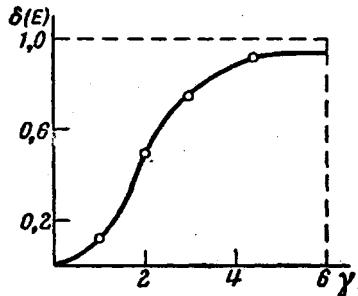


Рис. 2

Рис. 2. Теоретическая зависимость относительного изменения электропроводности от поля для жесткой молекулы

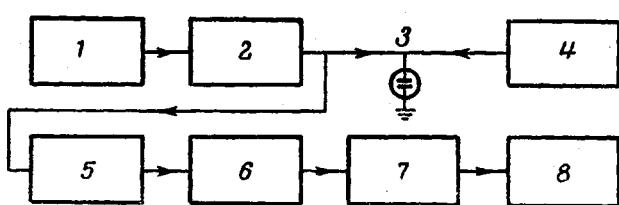


Рис. 3

Рис. 3. Блок-схема аппаратуры. Границчная частота фильтров высоких частот — 200 кГц, фильтров низких частот — 5 кГц:

1 — импульсный генератор; 2 — ФНЧ; 3 — ячейка; 4 — генератор 2000 кГц; 5 — ФВЧ; 6 — детектор; 7 — усилитель; 8 — осциллограф ЭНО1

Как видно из (2) и (3), поляризуемость и константа вращательной диффузии могут быть определены из одного измерения. Поляризуемость может быть также определена из сравнения теоретической зависимости эффекта от поля с экспериментальной (см. рис. 2).

Методика исследования

Блок-схема применяемой аппаратуры изображена на рис. 3. Изменение электропроводности регистрировали по изменению падения напряжения частоты 200 кГц на ячейке при наложении ориентирующего поля на те же электроды. Импульсный генератор вырабатывает одиночные импульсы длительности 1,0—10 мсек и амплитуды до 700 в, что соответствует полю в ячейке до 2,8 кВ/см. При прочих равных условиях измерительную частоту желательно иметь как можно выше, чтобы точнее измерять времена релаксации. Однако уменьшение сигнала с частотой не дает такой возможности. Частота 200 кГц в данном случае оказалась оптимальной.

Основным исследованным препаратом была ДНК тимуса. ДНК была получена по методу Керби с версией [5]. Молекулярный вес, определенный по характеристической вязкости, составлял 6—8 млн. Гипохромиз — около 40%, что свидетельствует о достаточно хорошошем препарате [6]. Препарат сохраняли в сухом виде над CaCl_2 и непосредственно перед измерением растворяли в дистиллированной воде. Раствор сохранял свои свойства в течение 6—10 час., что значительно превышало время, необходимое для измерений. Денатурацию производили нагреванием в кипящей водяной бане в течение 20 мин. с последующим быстрым охлаждением.

Экспериментальные данные

Зависимость величины сигнала от поля представлена на рис. 4. Отличие от теоретических кривых, по-видимому, объясняется неоднородностью препарата по молекулярному весу. Времена релаксации измеряли по фотографиям. Так, в поле 1440 в/см $\tau_E = 0,2$ мсек, $\tau_D = 0,4$ мсек (концентрация 0,003%). Константа вращательной диффузии найдена равной 420 сек. Если считать молекулу жестким вытянутым эллипсоидом вращения, то ее длина получается равной 3800 Å, что соответствует молекулярному

весу 600 000—700 000. Возможны две интерпретации этого результата. Во-первых, можно допустить, что молекула обладает значительной гибкостью и под действием поля происходит не столько ориентация, сколько деформация молекулярной цепи. Во-вторых, можно предположить, что длинная молекула ДНК состоит из нескольких коротких сегментов, имеющих молекулярный вес $\sim 600 000$. Мы не можем сказать, какое из этих предположений правильно, что же касается литературных данных, то они противоречивы. Однако, если принять справедливым второе предположение, т. е. наличие сегментальной подвижности молекул ДНК, то

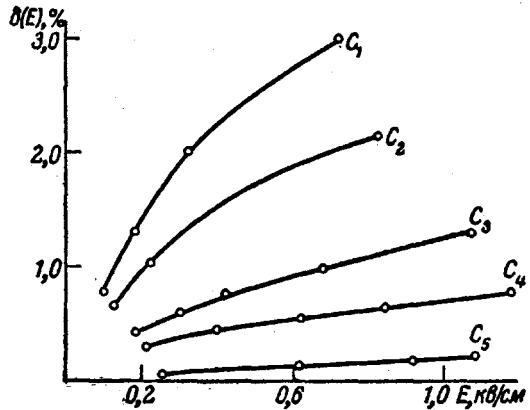


Рис. 4

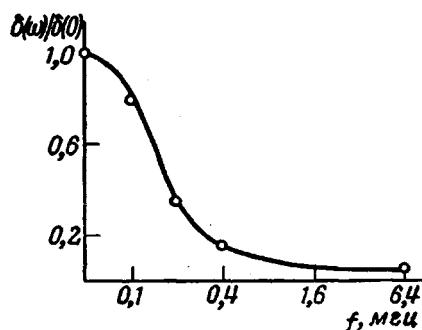


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость относительного изменения электропроводности от поля для водных растворов ДНК различных концентраций:

$$c_1 = 0,045\%; c_2 = 0,023\%; c_3 = 0,011\%; c_4 = 0,006\%; c_5 = 0,003\%$$

Рис. 5. Частотная зависимость сигнала для ДНК

поляризуемость, вычисленная по формуле (2), получается равной $3,8 \cdot 10^{-14}$, что составляет $1,8 \cdot 10^{-17}$ на одну фосфатную группу. Поляризуемость полифосфата, найденная аналогичным методом, равна $1,8 \cdot 10^{-17}$ на одну фосфатную группу [3, 4]. Эти результаты находятся в согласии с теорией ионной атмосферы, причем в данном случае ионная атмосфера образуется в основном вследствие диссоциации фосфатных групп. Это согласие может рассматриваться как подтверждение правильности второго предположения.

После денатурации величина сигнала в несколько раз уменьшалась. Времена релаксации были менее 0,1 меск.

Интересно отметить частотную зависимость сигнала для нативной ДНК (рис. 5). Кривая повторяет ход частотной зависимости диэлектрической постоянной, полученный автором при помощи обычной мостовой схемы. Это свидетельствует о том, что физический механизм поверхностной проводимости и поляризуемости в данном случае один и тот же.

Заключение

Описанный метод изучения ориентации очень удобен для исследования электрических свойств и конформации природных полимеров. Так как сигнал зависит от относительного изменения электропроводности, то возможно использование очень небольших количеств препарата (порядка 0,1—0,05 мл раствора), причем прозрачность раствора несущественна. Если физический механизм поверхностной проводимости и поляризуемости один и тот же, то метод может использоваться для диэлектрических измерений. Регистрируемая при этом величина пропорциональна относительному изменению диэлектрической постоянной раствора, которое в

достаточно больших полях достигает

$$\frac{1}{2} \frac{E_{\text{раствора}} - E_{\text{растворителя}}}{E_{\text{растворителя}}}.$$

Величина этого отношения (10^{-4}) легко регистрируется, что дает возможность изучать дисперсию диэлектрической постоянной даже при очень сильном разведении препарата, что невозможно при использовании методов, основанных на измерении абсолютного значения диэлектрической постоянной.

Возможности метода проиллюстрированы на примере нативной и денатурированной ДНК. Полученные при этом результаты представляют, однако, и самостоятельный интерес.

В качестве недостатков метода следует указать на вредное действие поляризации электродов и нагревания раствора в момент подачи ориентирующего импульса. Эти процессы приводят к наложению на сигнал помехи в виде линейно нарастающего за время импульса и медленно падающего после окончания импульса напряжения. При растворении препарата в дистиллированной воде помеха не превышает 0,05% (изменение электропроводности). Действие нагревания можно устранить, применив две пары скрещенных электродов и вычитя полученные на них изменения напряжения. Так как ориентация молекул делает раствор анизотропным, а нагревание изменяет электропроводность изотропно, то таким путем, в принципе, можно устраниć действие нагревания.

Автор выражает благодарность сотрудникам Лаборатории радиационной генетики Л. К. Кореневой, С. Е. Голубу, М. М. Мекшенкову, В. В. Назаренко и в особенности Г. А. Дворкину за ценные советы и обсуждение, а также Т. А. Казачинской за изготовление рисунков.

Выходы

1. Описан метод изучения ориентации макромолекул, использующий изменение электропроводности раствора. Указаны достоинства и недостатки метода в применении к природным полимерам. Метод может использоваться для диэлектрических измерений, обладая при этом большой чувствительностью.

2. Подвижной единицей при ориентации молекулы ДНК в электрическом поле является сегмент длиной 3800 Å. Поляризуемость такого сегмента найдена равной $3,8 \cdot 10^{-14}$, что почти полностью может быть отнесено за счет фосфатных групп.

Институт биофизики
АН СССР

Поступила в редакцию
13 VIII 1962

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Vépoit, Ann. Phys., 6, 561, 1951.
2. Г. А. Дворкин, Докл. АН СССР, 135, 739, 1960.
3. F. Eigen, G. Schawarg, J. Colloid. Sci., 12, 181, 1957.
4. G. Schawarg, Z. Phys., 145, 563, 1956.
5. R. Kirby, Biochem. J., 66, 495, 1957.
6. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, А. Н. Белозерский, Биохимия, 24, 600, 1959.

CONFORMATION AND ELECTRICAL PROPERTIES OF MACROMOLECULES BY THE ELECTROCONDUCTIVITY OF THEIR SOLUTIONS IN AN ELECTRIC FIELD.

V. K. Ravin

Summary

A method for determining the orientation of macromolecules from measurements of change in electroconductivity of the solution has been described. The method allows one to determine the polarizability and rotatory diffusion constant of the molecules and can also be utilized in dielectric measurements. The possibility of its application for biopolymers has been demonstrated on the example of DNA. On the basis of experimental data it has been proposed that the DNA molecules possess segmental mobility. The molecular weight of the segment is about 0.6 mill. The polarizability has been found to be $3.8 \cdot 10^{-14}$, which can be almost wholly ascribed to the phosphate groups.