

УДК 678.01:53

## ДИНАМИЧЕСКОЕ ДВОЙНОЕ ЛУЧЕПРЕЛОМЛЕНИЕ В РАСТВОРАХ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

III. ЗАВИСИМОСТЬ ОПТИЧЕСКОЙ АНИЗОТРОПИИ МОЛЕКУЛ  
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА

*Э. В. Фрисман, В. И. Воробьев, Л. В. Щагина*

В предыдущих работах [1] методами динамического двойного лучепреломления и вязкости была изучена оптическая анизотропия молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), позволившая сделать некоторые заключения об их жесткости в нативном и денатурированном состояниях. Была изучена также начальная стадия процесса денатурации растворов ДНК и зависимость жесткости цепи от ионной силы раствора.

В настоящей работе теми же методами изучались фракции ДНК, средние молекулярные веса которых различались более чем в 50 раз.

### Материал и методы

Натриевая соль ДНК была получена из зобной железы теленка путем предварительного выделения дезоксирибонуклеопротеида по методу Мирского [2] с последующей дегидратацией по Кирби [3]. Процентное содержание азота (N) и фосфора (P) в изучаемом образце ДНК составляло: N — 13,6%; P — 7,8%, что соответствует N/P = 1,74. Последнее указывает на очень незначительную примесь белка в препарате.

Фракции\* по молекулярным весам были получены озвучиванием раствора ДНК концентрации  $c = 0,03 \text{ г}/100 \text{ мл}$  в  $0,45 \text{ M NaCl}$ . При этом использовался пьезокварцевый ультразвуковой генератор с частотой колебаний 420 кгц. Время озвучивания варьировало от 1 до 60 мин.\*\* Во всех случаях ультразвуковое поле не оказывало влияния на величину атомного коэффициента экстинкции, равную  $E_p = 6500$ , что свидетельствует о нативности образцов ДНК.

Концентрации изучаемых растворов определяли по их поглощению в ультрафиолетовой области спектра после гидролиза  $0,5 \text{ M HClO}_4$  [4] и по содержанию фосфора.

Изучение величины и ориентации двойного лучепреломления в потоке растворов ДНК осуществлялось в динамооптиметре, использованном в работах [1], на оптической установке с полутеневым компенсатором [1, 5].

Известно, что характеристическая вязкость  $[\eta]$  высокомолекулярной ДНК существенно зависит от градиента скорости потока  $g$ , что приводит к необходимости определения вязкости в условиях  $g \rightarrow 0$ . Для этой цели использован усовершенствованный нами [6] ротационный вискозиметр [7], позволяющий производить измерения при очень малых  $g$ , что обеспечивает надежное определение вязкости при  $g = 0$ .

Все измерения проведены при  $21^\circ$ .

\* Называя наши образцы фракциями, мы не стремимся подчеркнуть их гомогенность.

\*\* Озвучивание производилось М. А. Хенохом и Л. Ф. Лысенко, которым мы выражаем благодарность.

## Результаты исследования

Изучена зависимость величины двойного лучепреломления ( $\Delta n$ ) и угла ориентации ( $\alpha$ ) от градиента скорости потока ( $g$ ) в растворах разных концентраций ( $c$ ) и разного молекулярного веса ( $M$ ) ДНК в  $0,15 M$  NaCl.

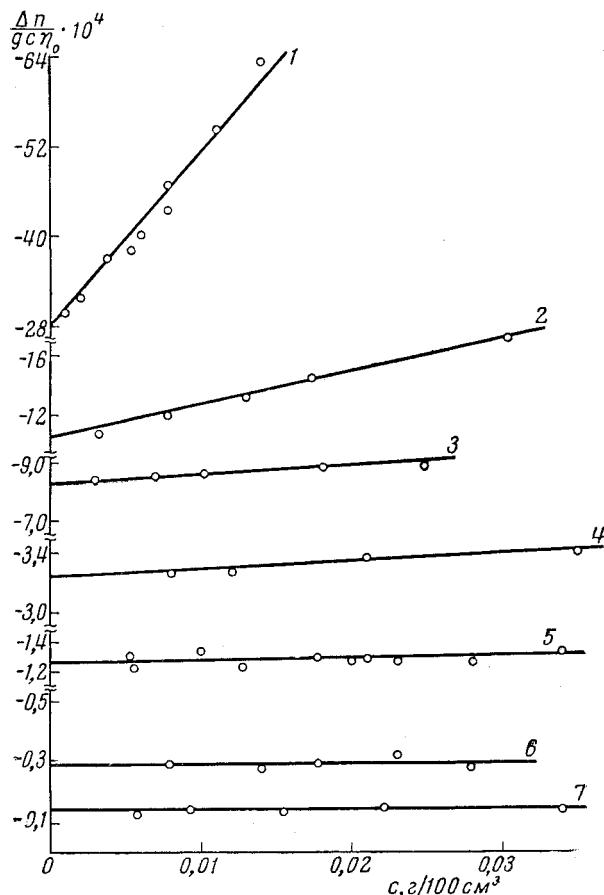


Рис. 1. Зависимость  $(\Delta n / gc\eta_0)_{g \rightarrow 0} = f(c)$  для растворов фракций ДНК в  $0,15 M$  NaCl.

Цифры на кривых соответствуют номерам фракций в таблице

В использованной нами области градиентов скорости  $\Delta n$  возрастает пропорционально  $g$  для всех изученных растворов.

На рис. 1 приведена зависимость  $(\Delta n / gc\eta_0)_{g \rightarrow 0} = f(c)$  ( $\eta_0$  — вязкость растворителя), позволяющая найти динамооптические постоянные, определяемые следующим образом:

$$[n] = (\Delta n / gc\eta_0)_{g \rightarrow 0, c \rightarrow 0}.$$

Величины  $[n]$  для разных образцов даны в таблице.

Для определения  $[\eta]$  при  $g = 0$  изучалась зависимость относительной вязкости  $\eta_r$  от  $g$ , характер которой приведен в работе [6].

Изображенная на рис. 2 зависимость  $((\eta_r - 1) / c)_{g=0} = f(c)$  позволяет получить характеристические вязкости  $[\eta]_{g=0}$  для всех изученных образцов.

Молекулярные веса фракций, вычисленные из соотношения [8]

$$[\eta] = 1,45 \cdot 10^6 M^{1,12}, \quad (1)$$

даны в таблице.

Отметим, что параллельное изучение характеристических вязкостей в капиллярном вискозиметре привело к следующим результатам: отношение  $[\eta]_g = 0 / [\eta]_g = 300 = 3,5$  для  $M = 9,1 \cdot 10^6$ ; 1,8 для  $M = 3,4 \cdot 10^6$ ; 1,24 для  $M = 1,8 \cdot 10^6$ . Начиная с  $M = 0,75 \cdot 10^6$  и ниже, приведенное отношение равно единице, т. е.  $[\eta]$  не зависит от  $g$ .

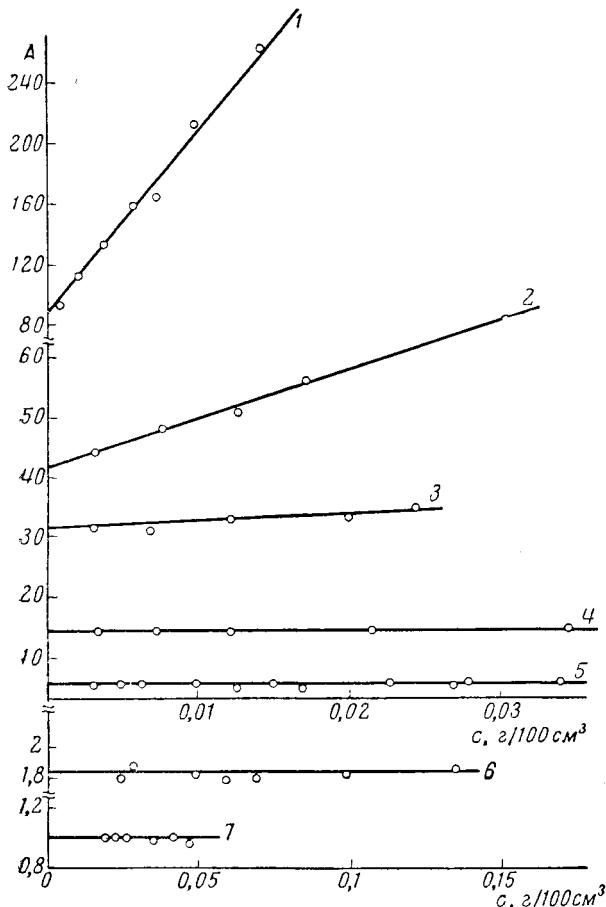


Рис. 2. Зависимость  $((\eta_r - 1)/c)_{g=0} = f(c)$  для растворов фракций ДНК в 0,15 M NaCl.

Цифры на кривых соответствуют номерам фракций в таблице. По оси ординат  $[(\eta_r - 1)/c]_{g=0} \cdot 10^{-2}$ , м.л./г (A)

#### Гидродинамические и оптические параметры молекул ДНК разного молекулярного веса

Фракция, №	$[\eta] \cdot 10^{-2}$ , см <sup>2</sup> /г	$M \cdot 10^{-6}$	$[n] \cdot 10^3$	$\frac{[n]}{[\eta]} \cdot 10^7$	$\frac{[n]_{fs}}{[\eta]} \cdot 10^7$	$\frac{[n]_i}{[\eta]} \cdot 10^7$	$D_r, 1/\text{сек}$
1 *	90	9,04	-2,80	-3,11	2,0	-5,11	5
2 *	44,5	4,55	-1,05	-2,54	2,0	-4,54	12
3	32	3,60	-0,83	-2,60	2,0	-4,60	17
4 *	14,4	1,77	-0,32	-2,25	2,0	-4,25	90
5 *	5,6	0,76	-0,13	-2,25	2,0	-4,25	—
6	1,8	0,28	-0,029	-1,6	2,0	-3,60	—
7	1,0	0,16	-0,014	-1,4	1,5	-2,90	—

\* Результат двух независимых серий измерений.

Изучена зависимость угла ориентации от градиента скорости потока в растворах разных концентраций для первых четырех фракций ДНК. В растворах остальных фракций угол ориентации оставался близким к  $45^\circ$  во всей исследованной нами области градиентов скорости и концентраций.

### Обсуждение результатов

Известно, что, независимо от выбранной модели, отношение  $[n]/[\eta]$  пропорционально оптической анизотропии ( $\gamma_1 - \gamma_2$ ) растворенных частиц. Для модели жестких палочек величины  $[n]/[\eta]$  и  $(\gamma_1 - \gamma_2)$  связаны между собой следующим образом [9]:

$$\frac{[n]}{[\eta]} = \frac{4\pi}{45kT} \frac{(n_s^2 + 2)^2}{n_s} (\gamma_1 - \gamma_2). \quad (2)$$

Здесь  $n_s$  — показатель преломления растворителя,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура.

Аналогичные уравнения, отличающиеся лишь численными коэффициентами, получены для жестких эллипсоидов [10] и гауссовых клубков [11].

В уравнении (2) величины  $(\gamma_1 - \gamma_2)$  включает в себя как собственную анизотропию  $(\gamma_1 - \gamma_2)_i$ , так и анизотропию, обусловленную геометрической асимметрией частиц (анизотропию макроформы) [12, 13].

Изучение оптической анизотропии дает чрезвычайно ценную информацию о жесткости полимерных цепей. Действительно, в случае гауссовых клубков величина  $(\gamma_1 - \gamma_2)_i$  равна  $3/5$  оптической анизотропии статистического сегмента ( $a_{\parallel} - a_{\perp}$ ) [14], которая в первом приближении может быть выражена через разность поляризуемостей мономерного звена ( $a_{\parallel} - a_{\perp}$ ) и число мономерных звеньев в сегменте  $S$  (длину жесткого участка цепи):

$$a_{\parallel} - a_{\perp} = (a_{\parallel} - a_{\perp}) \cdot S. \quad (3)$$

При этом, следовательно,  $(\gamma_1 - \gamma_2)_i$  не зависит от  $M$ , что и наблюдается на опыте (см., например, [15]) \*.

Для палочкообразных частиц длиной жесткого участка является гидродинамическая длина макромолекулы  $L$ :

$$(\gamma_1 - \gamma_2)_i = (a_{\parallel} - a_{\perp}) \cdot Z, \quad (4)$$

где  $Z$  — степень полимеризации. Здесь  $(\gamma_1 - \gamma_2)_i$  возрастает пропорционально молекулярному весу изучаемого полимера.

В ряде случаев, однако, указанные модели не могут описать оптические свойства реальных макромолекул, к которым, как мы увидим, следует отнести и молекулы ДНК.

Как уже отмечалось [1, 17], несмотря на большое различие в показателях преломления ДНК и растворителя, анизотропия формы молекул ДНК пренебрежимо мала в сравнении с ее собственной оптической анизотропией. Это подтверждается и результатами настоящей работы. Действительно, для каждого образца величины  $\Delta n / g\eta_0(\eta_r - 1)$ , полученные для растворов разных концентраций, остаются постоянными и совпадают со значениями  $[n]/[\eta]$ , что справедливо для систем, не обладающих эффектом макроформы [18, 19]. Зависимость  $[n]/[\eta]$  от  $M$ , представленная кривой 1 рис. 4, показывает, что с ростом молекулярного веса оптическая анизотропия молекул ДНК возрастает.

Приведенный график показывает, что оптическое поведение молекул ДНК отлично от поведения гауссовых клубков и жестких палочек.

В работе [20] было показано, что в ряде случаев существенную роль в измеряемой анизотропии может играть оптическая анизотропия микро-

\* Отметим, что в области весьма низких молекулярных весов обнаружена зависимость собственной анизотропии макромолекул от молекулярного веса [16].

формы, т. е. анизотропия формы жесткого участка цепи, которым определяется и собственная оптическая анизотропия. Если анизотропией формы всей макромолекулы можно пренебречь, то измеряемая величина  $[n]/[\eta]$  будет состоять из двух частей:  $[n]_i/[\eta]$  — характеризующей собственную анизотропию и  $[n]_{fs}/[\eta]$  — связанной с анизотропией микроформы и равной:

$$\frac{[n]_{fs}}{[\eta]} = \frac{(n_s^2 + 2)^2 (n_k^2 - n_s^2)^2 M_g \cdot S}{180 \pi R T n_s^3 \rho} (L_2 - L_1). \quad (5)$$

Здесь, кроме известных уже обозначений,  $\rho$  — плотность сухого полимера,  $n_k$  — его показатель преломления,  $M_g$  — молекулярный вес мономера,  $S$  — число мономеров в жестком участке цепи,  $(L_2 - L_1)$  — фактор формы жесткого участка цепи. В правой части уравнения (5) неизвестны лишь величины  $S$  и  $(L_2 - L_1)$ .

Так как молекула ДНК не описывается гауссовым клубком, то для определения  $S$  воспользуемся моделью «червеобразной цепи» [21, 22] и вычислим «персистентную длину»  $a$  по радиусам инерции, полученным из соотношения  $R_Z \sim M^{0.58}$ , данного в работе [8]. Это приводит к значению  $a = 550 \text{ \AA}$ , что соответствует  $S = 325$ . При этих условиях можно положить  $L_2 - L_1 = 2\pi$ .

В таблице даны значения  $[n]_i/[\eta]$ , вычисленные из соотношения:

$$-[n]_i/[\eta] = -[n]/[\eta] - [n]_{fs}/[\eta]. \quad (6)$$

Рис. 3. Зависимость  $[n]/[\eta] = f(M)$  для молекул ДНК в 0,15 M NaCl:

1 — без учета анизотропии микроформы; 2 — с учетом анизотропии микроформы

Подобный учет эффекта микроформы не может изменить характера зависимости оптической анизотропии молекул ДНК от  $M$  (рис. 3).

Следует отметить, что величина  $2a$  приблизительно совпадает с гидродинамической длиной молекулы ДНК 6-й фракции и превосходит значение  $L$  для последней фракции. Поэтому при вычислении  $[n]_{fs}/[\eta]$  для 7-й фракции величина  $S$  полагалась равной  $L/3,4$ , т. е. отношению гидродинамической длины к длине мономерного звена. Другими словами, молекула ДНК 7-й фракции аппроксимируется жесткой палочкой. К подобному заключению приводят также следующее сравнение. Если воспользоваться теорией характеристической вязкости, развитой для жестких цилиндров [23], положив диаметр цилиндра  $d = 20 \text{ \AA}$ , длину  $L = (M/660) \cdot 3,4 \text{ \AA}$ , то теоретическое значение  $[\eta] = 107 \text{ мл/г}$  хорошо согласуется с экспериментальным  $[\eta] = 100 \text{ мл/г}$ , полученным для 7-й фракции.

Палочкообразное строение молекулы ДНК 7-й фракции подтверждается и данными по изучению оптической анизотропии. Действительно, используя теоретическое значение оптической анизотропии мономерного звена молекулы ДНК ( $a_{||} - a_{\perp} = -150 \cdot 10^{-25} \text{ см}^3$ , вычисленное нами по схеме тензорной аддитивности поляризуемости связей [1], можно найти величину  $(\gamma_1 - \gamma_2)_i$  для палочки:  $(\gamma_1 - \gamma_2)_i = (a_{||} - a_{\perp})M/M_g = -3,7 \times 10^{-21} \text{ см}^3$ , которая хорошо согласуется с  $(\gamma_1 - \gamma_2)_i = 3,97 \cdot 10^{-21} \text{ см}^3$ , полученной по экспериментальным величинам при помощи уравнения (2).

Таким образом, на основании зависимости  $[n]_i/[\eta]$  от  $M$  (рис. 3) и последующих сравнений можно заключить, что при молекулярных весах  $M \geq 300\,000$  поведение молекулы ДНК (в 0,15 M NaCl) отличается от

поведения гауссова клубка и жесткой палочки, а скорее может быть описано моделью полужесткой цепочки. При меньших молекулярных весах изучаемая молекула хорошо аппроксимируется жесткой палочкой.

Если молекулу ДНК аппроксимировать эллипсоидом вращения, то при помощи коэффициентов вращательной диффузии  $D_r$ , найденных по углам ориентации [10] (таблица), можно оценить отношение его осей.

Известно, что уравнение, связывающее  $D_r$  с отношением осей вытянутых эллипсоидов  $P$ , содержит объем частицы в растворе, который входит также в соотношение между  $[\eta]$  и  $P$  [23]. Зная экспериментальные значения  $D_r$  и  $[\eta]$ , можно написать два уравнения, позволяющие исключить объем макромолекулы и определить  $P$ . Для полученных нами величин  $D_r$  и  $[\eta]$  необходимо было принять выражение для  $[\eta]$ , справедливое при  $P > 15$ . Проведенная оценка дает для эквивалентного эллипса значение  $P \approx 20$ .

В заключение приносим благодарность О. Б. Птицыну и Ю. Я. Готлибу за интересную дискуссию при обсуждении экспериментальных результатов.

## Выводы

1. Методами динамического двойного лучепреломления и вязкости изучена зависимость оптической анизотропии молекул ДНК (в 0,15 M NaCl) от молекулярного веса  $M$ . Образцы различных значений  $M$  получены воздействием ультразвука на растворы нативной ДНК.

2. Характер зависимости оптической анизотропии от молекулярного веса позволяет заключить, что молекулу ДНК можно аппроксимировать моделью полужесткой цепи. При весьма малом  $M$  молекула ДНК ведет себя, как жесткая палочка.

3. По экспериментальным значениям коэффициентов вращательной диффузии и характеристическим вязкостям проведена оценка отношения осей эквивалентного эллипса, которым мы аппроксимируем молекулу ДНК.

Ленинградский  
государственный университет  
им. А. А. Жданова  
Институт цитологии АН СССР

Поступила в редакцию  
17 VI 1963

## ЛИТЕРАТУРА

1. Э. В. Фрисман, В. И. Воробьев, Л. В. Щагина, Н. К. Яновская, Высокомолек. соед., 4, 762, 1962; 5, 622, 1963.
2. А. Е. Mirsky, A. W. Pollister, J. Gen. Physiol., 30, 117, 1946.
3. Н. S. Kirby, Biochem. J., 66, 495, 1957.
4. А. С. Сирин, Биохимия, 23, 656, 1958.
5. Э. В. Фрисман, В. Н. Цветков, Ж. эксперим. и теорет. физ., 23, 690, 1952.
6. Э. В. Фрисман, Л. В. Щагина, Авт. свид. № 36433, 1963.
7. В. Н. Zimm, D. M. Crothers, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 48, 905, 1962.
8. J. Eigner, Thesis, Harvard University, 1960.
9. W. Kuhn, H. Kuhn, R. Büchner, Ergebnn. exakt. Naturwiss., 25, 1, 1951.
10. A. Peterlin, H. A. Stuart, Z. Phys., 112, 1, 1939.
11. W. Kuhn, H. Kuhn, Helv. chim. acta, 26, 1394, 1943.
12. В. Н. Цветков, Э. В. Фрисман, Докл. АН СССР, 97, 647, 1954.
13. В. Н. Цветков, Э. В. Фрисман, О. Б. Птицын, С. Я. Котляр, Ж. техн. физ., 28, 1428, 1958.
14. W. Kuhn, F. Grün, Kolloid-Z., 101, 248, 1942.
15. Э. В. Фрисман, В. Н. Цветков, Ж. техн. физ., 25, 447, 1955.
16. Э. В. Фрисман, М. А. Сибилева, Высокомолек. соед., 3, 1284, 1961.
17. J. Léray, These de Docteur, L'université de Strasbourg, 1959.
18. A. Peterlin, J. Polymer Sci., 12, 45, 1954.
19. Э. В. Фрисман, М. А. Сибилева, А. В. Красноперова, Высокомолек. соед., 1, 598, 1959.
20. В. Н. Цветков, Высокомолек. соед., 5, 740, 1963.
21. О. Кратку, G. Porod, Rec. trav. chim., 68, 1106, 1949.
22. Ю. Е. Эйзнер, О. Б. Птицын, Высокомолек. соед., 4, 1725, 1962.
23. Г. Л. Фриш, Р. Симха, Сб.: Реология, Изд. ин. лит., 1962, стр. 612.

# FLOW BIREFRINGENCE IN SOLUTIONS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID

## III. DEPENDENCE OF THE OPTICAL ANISOTROPY OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID MOLECULES ON THE MOLECULAR WEIGHT

*E. V. Frisman, V. I. Vorobev, L. V. Shchagina*

### Summary

The optical anisotropy of native deoxyribonucleic acid molecules (DNA) in  $0.15 M$  NaCl in relation to its molecular weight  $M$  has been investigated by the flow birefringence and viscosity methods. Specimens of varying molecular weight were obtained by the action of ultrasonic waves on solutions of native DNA. The experiments have shown that the optical anisotropy increases with increase in molecular weight. Analysis of the experimental data leads to the conclusion that in the region of  $M = 3 \cdot 10^5 - 9 \cdot 10^6$  molecules the DNA molecule can be approximated by the semirigid chain model. At  $M \approx 1.7 \cdot 10^5$  the DNA molecules behave as rigid rods. With the aid of the rotatory diffusion coefficients (obtained from measurements of the orientation of birefringence) and viscosity characteristics an estimation of the ratio of the axes ( $r=20$ ) of the equivalent ellipsoid to which the DNA molecule has been approximated has been made.