

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том VII

СОЕДИНЕНИЯ

№ 11

1965

УДК 678.01 : 53

ДВОЙНОЕ ЛУЧЕПРЕЛОМЛЕНИЕ В ПОТОКЕ И ГИБКОСТЬ МОЛЕКУЛ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

В. Н. Цветков, Л. Н. Андреева, Л. Н. Квятченко

В предыдущей работе [1, 2] изучение величины Δn и угла ориентации двойного лучепреломления в потоке фрагментов ультразвуковой деструкции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) показало, что разность главных поляризумостей $\gamma_1 - \gamma_2$ молекул ДНК увеличивается с молекулярным весом M образца в соответствии с оптическими свойствами полужестких цепей [3].

С целью получения количественных данных о гибкости молекул ДНК опыты по исследованию динамического двойного лучепреломления деструктированных образцов ДНК были продолжены и расширены как по количеству изучаемых образцов, так и по области молекулярных весов. Фрагменты ДНК были получены облучением растворов ДНК ультразвуком и энзиматической деструкцией.

Образцы и методика измерений

Образцы тимусной ДНК были получены по методу [4]. В качестве источника ультразвука был использован кварцевый генератор мощностью 3 $\text{вт}/\text{см}^2$.

Реакцию ДНК — ДНК'аза проводили в среде 0,04 M tris-HCl, 0,008 M MgCl₂, 0,2 M NaCl, pH = 7,5. Как ультразвуковая, так и энзиматическая деструкция не сопровождалась сколько-нибудь заметным гипохромным эффектом, что указывало на отсутствие денатурации молекул при их разрыве.

Вязкости растворов измеряли на модифицированном [5] вискозиметре Зимма [6]. Как следует из рис. 1 и 2, при $(\eta_r - 1)/c < 10$ зависимость этой величины от градиента скорости g и концентрации c практически не наблюдается. Это дает возможность для растворов ДНК, приведенная вязкость которых меньше указанного предела, проводить измерения в вискозиметре Оствальда, принимая $(\eta_r - 1)/c$ равным характеристической вязкости $[\eta]$ раствора. Измерения величины двойного лучепреломления производили по стандартной методике, в динамооптиметрах с внутренним ротором. Длины двух использованных приборов составляли 6,6 и 3,0 см, ширина зазора 0,6 и 0,3 мм соответственно. Приборы были изготовлены из полистиlena. Измеряемое двойное лучепреломление во всех случаях было отрицательно по знаку и в исследованном интервале g пропорционально градиенту скорости g . Концентрации растворов ДНК определяли по содержанию фосфора после гидролиза 0,5 M HClO₄.

Реакцию ДНК — ДНК'аза проводили непосредственно в динамооптиметре путем введения в раствор ДНК соответствующего количества ДНК'азы. Пробы ($\sim 3,5 \text{ см}^3$) реагирующего раствора для измерения вязкости брали непосредственно из динамооптиметра. При этом условия реакции ДНК — ДНК'аза подобраны таким образом, чтобы в течение 6—10 минут, необходимых для измерения $\Delta n/g$ и η_r , деструкция не успела заметным образом повлиять на анизотропию и вязкость раствора.

На рис. 3 и 4 приведены графики зависимости изменения $\Delta n/g$ и η_r от времени для опытов II и III энзиматической деструкции ДНК. Продолжительность опытов составляет 6—8 час.

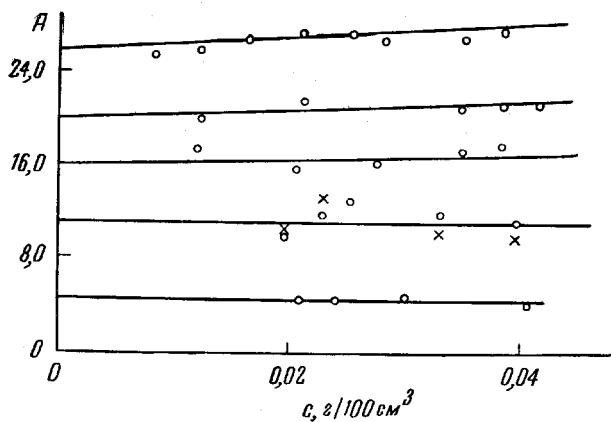


Рис. 1. Зависимость $(\eta_r - 1)_{g \rightarrow 0} / c (A)$ от концентрации c для ряда растворов фрагментов ДНК, полученных энзимной деградацией (опыт I)

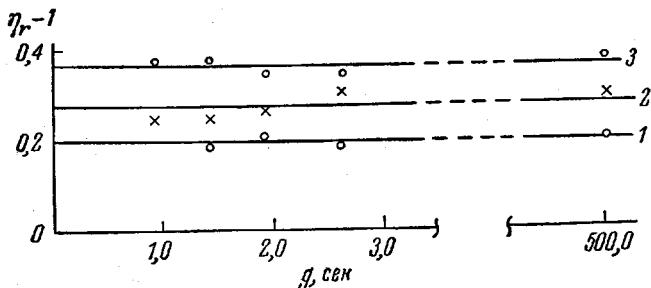


Рис. 2. Зависимость $\eta_r - 1$ от градиента скорости g для раствора фрагментов ДНК, полученных энзиматической деструкцией (опыт I):

Концентрация (c , $g/100 \text{ см}^3$): 1 — 0,019; 2 — 0,023; 3 — 0,038

Экспериментальные результаты и обсуждение

Молекулярные веса образцов были вычислены по значениям $[\eta]$ с использованием формулы [7]: $[\eta] = 1,45 \cdot 10^{-6} M^{1,12}$, полученной Доти для интервала молекулярных весов от $0,3 \cdot 10^6$ до $7,5 \cdot 10^6$. Величины

$$\frac{[n]}{[\eta]} = \frac{\Delta n}{g \eta_0 (\eta_r - 1)}$$

вычисляли по экспериментальным значениям $\Delta n / g$ и соответствующим им значениям η_r , взятым для одного и того же момента времени по рис. 3 и 4.

На рис. 5 представлена зависимость $[n] / [\eta] = f(M)$. Данные, обозначенные различными точками, относятся к различным способам деструкции. Экспериментальные точки (хотя и со значительным разбросом, связанным, по-видимому, с неполной идентичностью исследуемых образцов), группируются около кривой, которая в области молекулярных весов в несколько миллионов практически достигает своего предела, переходя в прямую, параллельную оси M . Это значит, что в указанной области гидродинамические и оптические свойства молекул ДНК соответствуют модели статистического гауссова клубка. Для столь жестких клубков, как молекулы ДНК, анизотропия макроформы ничтожна [8] и предельное значение $[n] / [\eta]$ определяется суммой двух членов, из которых первый про-

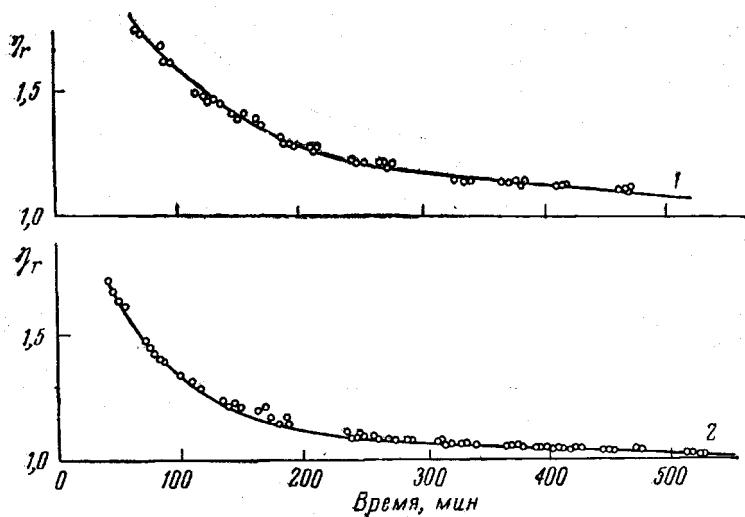


Рис. 3. Изменение относительной вязкости η_r раствора ДНК со временем при энзиматической деструкции:

1 — опыт I; 2 — опыт III

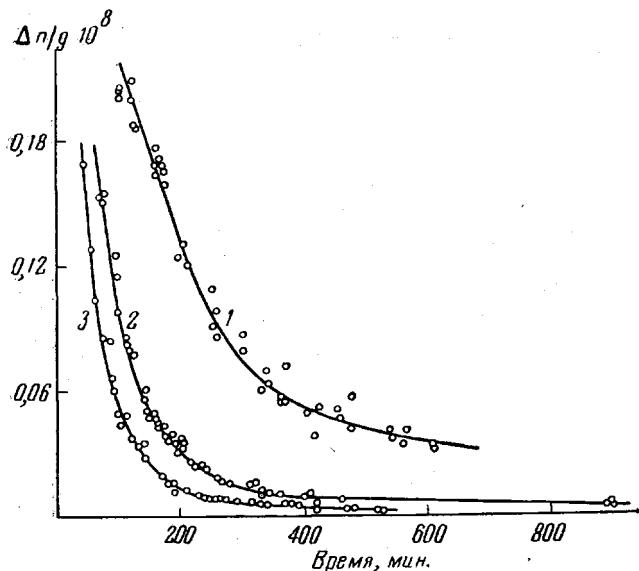


Рис. 4. Изменение двойного лучепреломления раствора ДНК со временем при энзиматической деструкции:

1 — опыт I; 2 — опыт II; 3 — опыт III

порционален собственной анизотропии макромолекулы, второй — анизотропии ее микроформы [8].

$$\lim_{M \rightarrow \infty} \frac{[n]}{[\eta]} = \frac{4\pi}{45kT} \cdot \frac{(n_s^2 + 2)^2}{n_s} \cdot S \left[\frac{1}{2} (a_{II} - a_I) (1 - 3 \sin^2 \varphi) + \right. \\ \left. + \frac{M_0 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{2\pi N_A v} \right], \quad (1)$$

где $a_{II} - a_I$ — разность главных поляризуемостей пары оснований, φ —

угол, образованный ее плоскостью с осью спирального участка, в котором находятся эти основания, S — число нуклеотидных пар в сегменте, \bar{v} — удельный парциальный объем, n_s — показатель преломления растворителя.

Полагая $\phi = 80^\circ$, принимая $a_{11} - a_1 = -186 \cdot 10^{-25} \text{ см}^3$, используя величину, рассчитанную по схеме тензорной аддитивности поляризуемостей связи мономерного звена ДНК [8] и найденное предельное значение $[n]/[\eta]$ по (1), можно вычислить S и соответственно персистентную длину биспиральной цепи ДНК $a = \frac{1}{2} S \cdot 3,4 \text{ \AA}$. Полученная таким образом величина a равна 330 \AA .

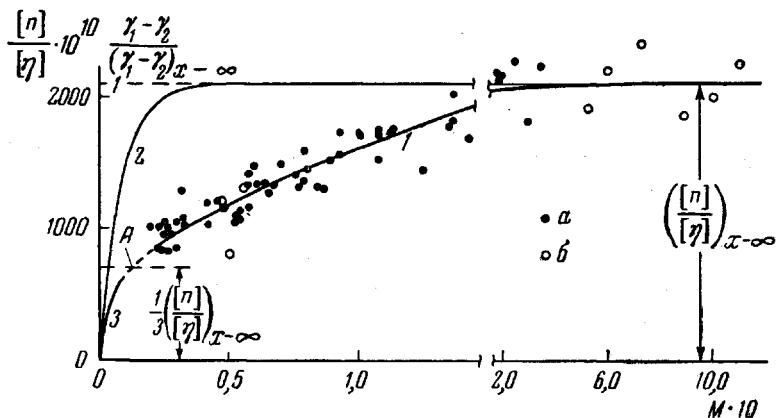


Рис. 5. Двойное лучепреломление растворов фрагментов ДНК различного молекулярного веса:

1 — кривая $[n][\eta] = f(M)$, проведенная по экспериментальным точкам:
а — фрагменты ДНК получены обработкой растворов ДНК'азой; б — фрагменты получены ультразвуковой деструкцией; 2 — кривая зависимости анизотропии молекулы $\gamma_1 - \gamma_2$ от $x = L/a$; 3 — начальный участок теоретической кривой $[n]/[\eta] = f(M)$

С уменьшением молекулярного веса величина $[n]/[\eta]$ уменьшается, указывая на отклонение оптических свойств молекул от свойств гауссовых цепей. Экспериментальная зависимость $[n]/[\eta] = f(M)$ может быть сопоставлена с теоретической [9], полученной с использованием теории оптической анизотропии персистентных цепей [3]. Согласно [9] персистентная длина a может быть определена по точке пересечения A экспериментальной кривой $[n]/[\eta] = f(M)$ с прямой, параллельной оси абсцисс и имеющей ординату, равную $(1/3) \lim_{M \rightarrow \infty} [n]/[\eta]$. При этом абсцисса точки пересечения соответствует контурной длине молекулы $L_A \approx 2,5 a$.

В рассматриваемом случае нахождение точки A связано со значительной погрешностью, поскольку экспериментальные точки кривой 1 характеризуются большим разбросом. В то же время экстраполяция кривой 1 до пересечения с указанной прямой дает для абсциссы точки A величину $M_A \approx (150 \pm 25) \cdot 10^3$, что соответствует отрезку биспиральной цепи ДНК с контурной длиной $L_A = (735 \pm 125) \text{ \AA}$. Отсюда для персистентной длины находим $a = 0,4 L_A = (290 \pm 50) \text{ \AA}$, что удовлетворительно согласуется с величиной 330 \AA , найденной выше по предельному значению $\lim_{M \rightarrow \infty} [n]/[\eta]$. Полученное значение a также находится в хорошем согласии с данными, найденными гидродинамическими методами [10]. Найденная величина a , вдвое превышающая персистентную длину молекулы нитроцеллюлозы [11], свидетельствует о большой жесткости биспиральной структуры ДНК. В то же время величина a для ДНК оказывается в 2—3 раза меньше персистентной длины α -спирали поли- γ -бензил- L -глутамата [12].

Кривая 3 на рис. 5 изображает начальный участок теоретической зависимости $[n]/[\eta] = f(M)$ [9], который при экстраполяции (пунктир)

смыкается с экспериментальной кривой 1. Кривая 2 представляет зависимость от M равновесной анизотропии макромолекулы $\gamma_1 - \gamma_2$ [3]. В соответствии с теорией [9], при совмещении предельных значений $\gamma_1 - \gamma_2$ и $[n] / [\eta]$ вторая кривая во всей области M лежит ниже первой.

Выводы

1. Исследовано двойное лучепреломление в потоке $[n]$ и вязкость $[\eta]$ растворов фрагментов ультразвуковой и энзиматической деструкций ДНК в области молекулярных весов M от $0,2 \cdot 10^6$ до $11 \cdot 10^6$.

2. Экспериментальные значения $[n] / [\eta]$ возрастают с увеличением молекулярного веса образца, причем в области больших M кривая зависимости $[n] / [\eta] = f(M)$ практически достигает предела, переходя в прямую параллельную оси M . Сравнение этой кривой с теоретической зависимостью [3] анизотропии молекулы $\gamma_1 - \gamma_2$ от молекулярного веса показывает, что в соответствии с теорией [9], при совмещении предельных значений кривых $\gamma_1 - \gamma_2$ и $[n] / [\eta]$ вторая кривая расположена ниже первой, во всей области значений M .

3. С использованием теоретической величины анизотропии мономерного звена ДНК [8] и с учетом эффекта микроформы [8] предельное значение $[n] / [\eta]$, полученное для больших M , используется для вычисления персистентной длины цепи a , которая оказывается равной 330 Å.

4. Другим, независимым методом определения a является использование хода кривой $[n] / [\eta] = f(M)$ в области малых M [9]. Применение этого метода дает для персистентной длины величину $a = 290$ Å. Оба значения a следует считать совпадающими в пределах погрешности опыта.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
10 III 1965

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Н. Цветков, Л. Н. Андреева, В. И. Сисенко. Сб. Молекулярная биофизика, 1965, стр. 110.
2. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворах, Изд. «Наука», М., 1964, стр. 619.
3. В. Н. Цветков, Высокомолек. соед., 4, 894, 1962.
4. J. S. Colter, R. A. Broughton, K. A. O. Eilem, Biochim. biophys. acta, 55, 31, 1962.
5. В. Н. Цветков, Е. В. Корчевская, Вестн. ЛГУ, 22, № 4, 1965.
6. B. Zimm, D. Crothers, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 905, 1962.
7. P. Doty, B. McGill, S. Rise, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 44, 411, 1958.
8. В. Н. Цветков, Высокомолек. соед., 5, 740, 1963.
9. В. Н. Цветков, Высокомолек. соед., 7, 1968, 1965.
10. I. E. Hearst, W. H. Stockmayer, J. Chem. Phys., 37, 1425, 1962.
11. В. Н. Цветков, И. Н. Штеникова, Н. А. Межерицкая, Л. С. Болотникова, Сб. Целлюлоза и ее производные, Изд. АН СССР, 1963, стр. 74.
12. В. Н. Цветков, И. Н. Штеникова, Е. И. Рюмцев, Г. И. Охрименко, Высокомолек. соед., 7, 1104, 1965.

FLOW BIREFRINGENCE AND FLEXIBILITY OF DESOXYRIBONUCLEIC ACID MOLECULES

V. N. Tsvetkov, L. N. Andreeva, L. N. Kvitchenko

Summary

The flow birefringence $[n]$ and viscosity $[\eta]$ of solutions of desoxyribonucleic acid fragments obtained by ultrasonic and enzymatic degradation have been investigated. The experimental value for the dependence of $[n] / [\eta]$ on the molecular weight has been used for determining the persistent length a of the DNA molecule. The value of a obtained from the limiting values and from the initial course of the $[n] / [\eta]$ curve turned out to be practically coincident and are equal to ~ 300 Å within the limits of experimental error.