

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕПЛОТЫ ПЕРЕХОДА СПИРАЛЬ — КЛУБОК
ИЗ КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ
КИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЯЗИ
МЕЖДУ ЦЕПЯМИ**

***В. И. Пермогоров, М. Д. Франк-Каменецкий,
Л. А. Сердюкова, Ю. С. Лазуркин***

В настоящее время все еще нет надежных данных по значениям энергии связи комплементарных цепей в двойной спирали дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) *. Это обусловлено главным образом экспериментальными трудностями прямого микрокалориметрического определения этой величины. При использовании даже наиболее совершенных микрокалориметров [1, 2] приходится работать при больших концентрациях ДНК (порядка 0,1—0,01 %), что отражается на надежности результатов, поскольку при таких условиях возможна агрегация ДНК.

Поэтому представляет существенный интерес измерение энергии связи другими, не столь прямыми методами, позволяющими, однако, работать при таких разбавлениях, когда заранее можно пренебречь межмолекулярными взаимодействиями.

Один из таких методов основан на измерении кривых плавления ДНК (т. е. кривых зависимости доли разделенных пар нуклеотидов от температуры) при различных рН [3, 4].

Указанными методами к настоящему времени получены значения энергии связи U на пару нуклеотидов от ~ 5 ккал/моль в ранних работах до 8 [2, 3]—11 ккал/моль [4] при физиологических ионных силах ($0,15 M$ NaCl). Недавно Привалов получил в этих условиях при помощи микрокалориметра величину $7,8 \pm 0,5$ ккал/моль [5].

Нами разработан метод определения энергии связи U , использующий введение в ДНК небольшого количества локальных межмолекулярных или ковалентных дополнительных связей — скрепок между комплементарными цепями. При действии на ДНК некоторых красителей (актиномицин, акридин оранжевый) кривая плавления ДНК претерпевает характерные изменения: возрастает температура плавления и увеличивается ширина интервала плавления [8, 9]. Количественное исследование этих эффектов позволяет, как показывает теория этого явления [6, 7], получить данные о теплоте плавления чистой ДНК.

Конечные формулы теории для случая, когда концентрация скрепок, равномерно или случайным образом распределенных по молекуле ДНК, мала и постоянна, имеют вид:

$$\delta T_m = 2 \frac{p - 1}{p + 1} \frac{T_0^2}{U} c \quad (1)$$

$$\delta \Delta T_m = 4 \left(\frac{p - 1}{p + 1} \right)^2 \frac{T_0^2}{U} c, \quad (2)$$

* Точнее, при этом речь идет всегда о теплоте перехода спираль — клубок, т. е. о разности энергий этих двух состояний молекулы ДНК, в расчете на пару нуклеотидов.

где δT_m — повышение температуры плавления, $\delta \Delta T_m$ — увеличение ширины интервала плавления, T_0 — температура плавления ДНК без скрепок; $p = e^{\Delta/T}$, где Δ — свободная энергия, добавляемая скрепкой к энергии связи пары нуклеотидов; температура выражена в энергетических единицах, U — средняя энергия связи пары нуклеотидов в отсутствие скрепок, c — концентрация скрепок в молекуле ДНК (их число на пару нуклеотидов).

Если все введенные в раствор молекулы красителя связаны с ДНК, причем каждая скрепка образована одной молекулой красителя, то концентрация скрепок определяется по формуле $c = 2D/P$, где D — молярная концентрация красителя в растворе, P — молярная концентрация нуклеотидов ДНК.

Измерив экспериментально зависимость δT_m и $\delta \Delta T_m$ от c , можно определить по простым формулам (1), (2) энергию связи U и дополнительную энергию Δ . При этом, однако необходи́ма уверенность в том, что по мере плавления ДНК молекулы красителя не уходят в раствор, а остаются связанными с молекулами ДНК. Более детальное рассмотрение показывает, что при этом нет необходимости в соблюдении этого условия на протяжении всей кривой плавления. Достаточно, чтобы оно практически выполнялось до тех пор, пока плавление не пройдет на $\sim 60\text{--}70\%$; после этого освобождение красителя не вносит существенной ошибки в результаты измерений δT_m и $\delta \Delta T_m$.

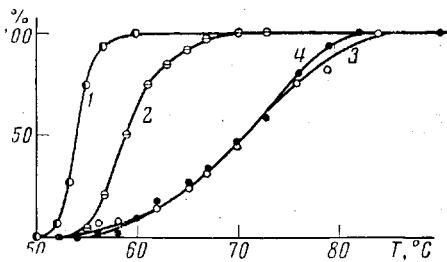
Оказалось, что для актиномицина, профлавина и акридина оранжевого это условие выполняется при низкой ионной силе раствора.

Ниже приводятся результаты опытов с этими красителями (см. рисунок и таблицу).

Значения энергии связи пары оснований U и другие величины, полученные из анализа кривых плавления ДНК фага T_2 с тремя красителями

| Краситель | U , ккал/моль | p | Δ , ккал/моль | Число опытов | Максимальная концентрация, с | $\frac{\Delta T_m}{U T_0^2}$ | $\frac{\delta T_m}{\delta \Delta T_m}$ | Концентрация ДНК | |
|-------------------|-----------------|------------|----------------------|--------------|------------------------------|------------------------------|--|------------------|---|
| | | | | | | | | мкг/мл | % |
| Актиномицин | $2,3 \pm 0,5$ | ~ 6 | ~ 1 | 10 | 10^{-2} | 0,036 | 33—37 | 0,0035 | |
| Акридин оранжевый | $2,6 \pm 0,8$ | $\sim 2,1$ | $\sim 0,5$ | 4 | $5 \cdot 10^{-2}$ | 0,084 | 37,5 | 0,0038 | |
| Профлавин | $3,3 \pm 1,0$ | $\sim 2,5$ | $\sim 0,6$ | 8 | $7 \cdot 10^{-2}$ | 0,085 | 30,0 | 0,0030 | |

На рисунке приведены характерные кривые плавления чистой ДНК (кривая 1) и ДНК с профлавином (кривая 2). Эти кривые плавления получены обычным методом, путем измерения оптической плотности раствора при $\lambda = 260 \text{ м}\mu$ при разных температурах, с выдержкой при каждой температуре в течение 10—15 мин.; приведены кривые освобождения (ухода в раствор) молекул профлавина (кривые 3 и 4), также полученные спектрофотометрическим методом. При этом долю освободившегося профлавина определяли по изменению оптической плотности при $\lambda = 435$ (кривая 3) и $470 \text{ м}\mu$ (кривая 4). Расхождение кривых 3 и 4 характеризует точность определения доли освободившегося профлавина. Совпадение оказывается вполне удовлетворительным. В случае акридина оранжевого ока-



Кривые плавления чистой ДНК (1), ДНК с профлавином (2) и освобождения профлавина (3, 4)

$c = 6,7 \cdot 10^{-2}$. Раствор в цитратном буфере 0,001 М, рН 6,0

освободившегося красителя определяли по изменению оптической плотности в полосе $\lambda = 504 \text{ мкм}$; этот максимум появляется только у связанного акридина оранжевого. Это определение может быть несколько менее точным и шкала по оси ординат не строго линейной. Однако и в том, и в другом случае мы убеждаемся с достаточной надежностью в выполнении условия применимости формул (1) и (2). На кривой 2 заметна затяжка окончания плавления ДНК, связанной с красителем. При больших концентрациях это явление оказывается еще более резко выраженным для всех трех красителей и обусловлено, вероятно, тем, что на сохранившихся биспиральных участках молекул ДНК увеличивается концентрация связанного красителя, повышающего температуру плавления этих участков.

В таблице приведены данные, полученные из опытов с тремя красителями. При этом в столбце 5 указано число опытов. Каждый опыт состоит в получении двух кривых плавления — чистой ДНК и ДНК с красителем, из которых определены величины U и Δ . В столбце 6 приведены максимальные концентрации красителя, при которых еще сохраняется линейная зависимость δT_m и $\delta\Delta T_m$ от c . Наконец, в столбце 7 приведена величина $U(\Delta T_m / T_0^2) |\delta T_m / \delta\Delta T_m|$, малость которой по сравнению с единицей является дополнительным условием применимости формулы (2) (см. [7]).

Следует заметить, что величина Δ определяется в этих опытах с очень малой точностью, так как, особенно при достаточно больших p , от этой величины (а следовательно и от Δ) очень мало зависят величины δT_m и $\delta\Delta T_m$. Иначе говоря, при достаточно прочных скрепках величина добавочной энергии Δ не существенна, важна лишь концентрация скрепок.

Значения теплоты плавления ДНК полученные из опытов с различными красителями, оказались близкими (с учетом точности определения, составляющей 20—30 %), что говорит в пользу правильности предлагаемого метода. Среднее значение U равно $2,7 \pm 0,7 \text{ ккал/моль}$. При этом, однако, значения U оказались существенно меньше, чем приводимые другими авторами. Это обусловлено, очевидно, тем, что наши опыты проведены при низких ионных силах, когда чистая ДНК плавится в среднем при $T_0 = 55^\circ$. Из микрокалориметрических данных [5] также следует, что теплота плавления резко падает с уменьшением ионной силы раствора. Тот факт, что энергия связи пары нуклеотидов в двойной спирали ДНК столь сильно зависит от ионной силы, представляет существенный теоретический интерес для выяснения характера экранирования зарядов, расположенных на нитях двойной спирали, противоионами из раствора.

Из полученных результатов может быть сделан еще один вывод. По-видимому, эти результаты подтверждают предположение о том, что все исследованные красители образуют при тех малых концентрациях, которые применялись, мономолекулярные скрепки. В противном случае мы получили бы для U гораздо более низкие значения, резко расходящиеся с предварительными данными микрокалориметрических измерений и трудно поддающиеся объяснению.

Из изложенного следует, что при соблюдении необходимых условий (малость концентрации красителя, сохранение его связи с ДНК на протяжении большей части кривой плавления) метод скрепок позволяет определить теплоту плавления чистой ДНК. В настоящей работе это удалось выполнить лишь при малых ионных силах. При этом опыты проводили при концентрациях ДНК, значительно меньших, чем в микрокалориметрических опытах. Исследования в широком интервале значений ионной силы осложняются в случае красителей тем, что при этом пришлось бы воспользоваться полными формулами [7], требующими знания коэффициентов связи красителя с нативной и денатурированной ДНК при разных температурах. Можно, однако, надеяться, что использование прочных ковалентных спивок позволит осуществить измерения в широком интервале значений ионной силы.

Выводы

Предлагается метод определения энергии связи комплементарных цепочек ДНК, основанный на измерении температуры и ширины интервала плавления ДНК со скрепками. Метод позволяет определять энергию связи для разбавленных растворов ДНК ($\sim 10^{-4} M$). Проделанные при низких ионных силах измерения дали для энергии связи в расчете на пару нуклеотидов величину $2,7 \pm 0,7$ ккал/моль.

Поступила в редакцию
19 VII 1964

ЛИТЕРАТУРА

1. П. Л. Привалов, К. А. Кафиани, Д. Р. Монаселидзе, Докл. АН СССР, **156**, 951, 1964.
2. M. A. Rawitscher, P. D. Ross, J. M. Sturtevant, J. Amer. Chem. Soc., **85**, 1915, 1963.
3. Т. М. Бирштейн, Биофизика, **7**, 513, 1962.
4. Б. Н. Сухоруков, Ю. Ш. Мошковский, Т. М. Бирштейн, В. Н. Лысов, Биофизика, **8**, 294, 1963.
5. П. Л. Привалов, Докл. на I Всес. биохимич. съезде, Л., 1964.
6. М. Д. Франк-Каменецкий, Докл. АН СССР, **157**, 187, 1964.
7. М. Д. Франк-Каменецкий, Высокомолек. соед., **7**, 354, 1965.
8. В. И. Пермогоров, Ю. С. Лазуркин, Биофизика, **10**, 17, 1965.
9. В. И. Пермогоров, А. А. Прозоров, М. Ф. Шемякин, Ю. С. Лазуркин, Р. Б. Хесин, Молекулярная биофизика, сб. статей, М., 1965.

DETERMINATION OF THE HEATS OF HELIX—COIL TRANSITION FROM THE MELTING CURVES OF DESOXYRIBONUCLEIC ACID WITH ADDITIONAL INTERCHAIN LINKAGES

*V. I. Permogorov, M. D. Frank-Kamenetskii,
L. A. Serdyukova, Yu. S. Lazurkin*

Summary

The melting curves of complexes of actinomycin acridine orange and proflavine with DNA of phage T2 have been investigated. Based on the earlier developed theory of the helix—coil transition of DNA containing additional linkages between the chains, a new method has been proposed for determining the heats of the helix—coil transition for DNA. This method allows the determinations to be carried out at low ion strengths. It was found that the heat of helix—coil transition for DNA strongly depends on the ionic strength of the solution and at $T_m = 55^\circ$ amounts to $2,7 \pm 0,7$ kcal/mole.