

УДК 547.963.3:678.01:53

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ
НА ОПТИЧЕСКИЕ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ
МОЛЕКУЛ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

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

При денатурации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), сопровождающейся разрушением двойной спирали, надо ожидать существенного изменения структуры и термодинамической гибкости макромолекул. Эти изменения зависят от условий денатурации и могут быть исследованы путем изучения оптических и гидродинамических параметров макромолекул.

В этой работе результаты тепловой денатурации анализировали по динамическому двойному лучепреломлению, вязкости и оптической плотности растворов ДНК.

Согласно теории [1—5], отношение динамооптической постоянной к характеристической вязкости образца ($[n] / [\eta]$) пропорционально разности поляризуемостей изучаемых макромолекул в бесконечно разбавленном растворе ($\gamma_1 - \gamma_2$). При этом величина $\gamma_1 - \gamma_2$ может определяться как собственной анизотропией, зависящей от структуры и термодинамической гибкости цепи, так и анизотропией макро- и микроформы, связанных соответственно с асимметрией молекулярного эллипсоида и жесткого участка цепи, вдоль которого сохраняется корреляция в ориентации мономеров.

Анизотропия формы может наблюдаться только в случае различия в показателях преломления полимера n_k и растворителя n_s . Однако в нативном состоянии собственная анизотропия молекулы ДНК так велика, что несмотря на большое значение $n_k - n_s$ не удается обнаружить заметного влияния анизотропии макроформы на оптическое поведение раствора [6—8]. В полностью денатурированном состоянии, напротив, основную роль в двойном лучепреломлении играет эффект макроформы, как это следует из результатов этой работы. Анизотропию микроформы, к сожалению, экспериментально определить практически нельзя и приходится оценивать эту величину из теоретических соображений.

Изучение денатурированного состояния ДНК представляет значительный интерес в связи с выяснением процесса ее репликации в клетке.

Образцы и метод исследования

Исследовали тепловую денатурацию патриевой соли ДНК забойной железы теленка. Молекулярный вес образца (M) 17 400 000 (по характеристической вязкости в 0,45 M растворе NaCl из соотношения: $[\eta]_0 = 6,9 \cdot 10^{-4} M^{0.7}$ [9]). Отношение содержания азота к фосфору (N/P) в ДНК составляло 1,74, а мольный коэффициент экстинкции $E_{260}(P) = 6300$.

Двойное лучепреломление в потоке измеряли на использованной ранее установке [6, 10]. Характеристическую вязкость $[\eta]_0$ при градиенте скорости $g = 0$ определяли при помощи ротационного магнитного вискозиметра [11]. По относительным вязкостям η_r , измеренным в капиллярном вискозиметре, находили величину $[\eta]_g$ при

конечном значении g . Все исследования выполнены при 21° , только в некоторых случаях величины $[\eta]_g$ измерены при 70° .

Значения $E_{260}(P)$ определяли на спектрофотометре СФ-4.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнение экспериментального значения оптической анизотропии молекулы нативной ДНК с анизотропией мономерного звена, вычисленной по схеме тензорной аддитивности поляризуемостей связей, показало [6], что большая отрицательная анизотропия этих молекул является следствием характера упаковки в них азотистых оснований [12, 13] и большой термодинамической жесткости цепи. При денатурации ДНК надо ожидать существенного изменения оптической анизотропии, связанного с изменением гибкости основной цепи и боковых групп макромолекулы.

Известно, однако, что при большой ионной силе и значительной концентрации ДНК, прогревание раствора при температуре денатурации с последующим быстрым охлаждением, как правило, не обеспечивает разделения цепей. Об этом свидетельствуют большое отрицательное значение оптической анизотропии макромолекул и большая характеристическая вязкость ДНК, полученные нами при указанных условиях денатурации [6]. Эти опыты и полученные для рассматриваемых растворов значения $E_{260}(P)$ можно понять, если допустить, что при охлаждении раствора возникает значительное число межмолекулярных водородных связей, приводящее к агрегации макромолекул [6].

Вероятность агрегации существенно падает при уменьшении концентрации ДНК и ионной силы раствора [14]. В связи с этим, прогреванию подвергали раствор ДНК в воде с концентрацией сДНК, равной $0,06 \text{ г}/100 \text{ мл}$. Денатурацию проводили при 100° в течение 15 мин. После прогревания раствор охлаждали при 0° . Все измерения проводили при ионной силе $0,15 M$ раствора NaCl .

Из рис. 1 следует, что величина $\Delta n / g\eta_0(\eta_r - 1)$, пропорциональная оптической анизотропии макромолекулы при конечной концентрации раствора [15], не зависит от c и совпадает со значением $[n] / [\eta]$. Таким образом, как и в случае растворов нативной ДНК [6], эффект макроформы играет здесь пренебрежимо малую роль. Большое отрицательное значение $[n] / [\eta]$ (табл. 1), а следовательно и собственной оптической анизотропии может быть обусловлено возникновением упорядоченной структуры в макромолекуле при охлаждении раствора и добавлении NaCl . Об этом свидетельствует также и величина $E_{260}(P)$.

Опыт показал, что для исследуемого образца наблюдается большое обратимое возрастание характеристической вязкости с температурой (табл. 1), которое нельзя объяснить лишь объемными эффектами, она напоминает эффект, обнаруженный при изучении рибонуклеиновой кислоты (РНК) [16, 17]. Это позволяет предположить, что упорядоченность в изучаемых макромолекулах вызвана возникновением внутримолекулярных водородных связей в однотяжевой цепи. Возможно, что большая компактность макромолекул определяет и малое значение $[\eta]$. Однако положительное и сравнительно малое значение $[n] / [\eta] = 2,6 \cdot 10^{-9}$, полученное нами для РНК в $0,15 M$ растворе NaCl указывает на существенное различие в структурах рассматриваемых макромолекул.

Таким образом, при тепловой денатурации ДНК в водных или солевых растворах охлаждение обычно сопровождается возникновением внутри- или межмолекулярных водородных связей.

Иная картина наблюдается при нагревании раствора ДНК в присутствии формальдегида (CH_2O), который быстро реагирует с аминогруппами азотистых оснований, обнажающимися в результате диссоциации водородных связей. Это позволяет получить однотяжные нити, лишенные водородных связей.

Детальное исследование условий тепловой денатурации в растворах разных концентраций ДНК и CH_2O показало, что при $c_{\text{ДНК}} = 0,15 \text{ г}/100 \text{ мл}$, разделение цепей имеет место при содержании 6% формальдегида и нагревании в течение 10 мин. при $90-95^\circ$ в бессолевой среде. Пос-

Таблица 1

Оптические и гидродинамические параметры нуклеиновых кислот
в зависимости от условий денатурации

Образец	$[n] \cdot 10^5$	$[\eta]_0^{21^\circ} \cdot 10^{-2}, \text{мл/г}$	$[\eta]_g^{21^\circ} \cdot 10^{-2}, \text{мл/г}$	$[\eta]_g^{70^\circ} \cdot 10^{-2}, \text{мл/г}$	$[\eta]_g^{70^\circ} / [\eta]_g^{21^\circ}$	$\frac{[n]}{[\eta]_g^{21}} \cdot 10^4$	$E_{260}(P)$
ДНК прогрета в H_2O 15 мин. при 100°	-2,2	1,7	1,7	5,0	2,94	-13	7100
ДНК прогрета в $\text{H}_2\text{O} + 6\% \text{CH}_2\text{O}$ 10 мин. при 90°	+0,35	--	12,5	--	--	+0,28	9200
ДНК прогрета в $\text{H}_2\text{O} + 6\% \text{CH}_2\text{O}$ 10 мин. при 92°	+0,31	11,9	10,4	10,4	1,0	+0,30	9200
ДНК прогрета в $\text{H}_2\text{O} + 6\% \text{CH}_2\text{O}$ 10 мин. при 95°	+0,17	--	3,8	--	--	0,45	9200
РНК прогрета в $\text{H}_2\text{O} + 6\% \text{CH}_2\text{O}$ 10 мин. при 70°	+0,045	--	1,5	--	--	+0,30	10000

ле денатурации ионную силу доводили до $0,15 M \text{NaCl}$, при которой и были проведены измерения двойного лучепреломления, вязкости и оптической плотности.

На рис. 2 и 3 изображены результаты концентрационных измерений двойного лучепреломления для растворов ДНК, прогретых при трех температурах. Величины $[n]$, $[\eta]_0$, $[\eta]_g$ и $E_{260}(P)$ помещены в табл. 1.

Значения $E_{260}(P)$, не зависящие от температуры в интервале $21-85^\circ$, указывают на отсутствие водородных связей в молекуле ДНК, денатурированной в присутствии формальдегида. Характеристическая вязкость слабо зависит от градиента скорости потока и не зависит от температуры.

Двойное лучепреломление в изучаемых системах положительно, а величина его соизмерима с получаемой для растворов гибких макромолекул. Но согласно расчету, спиральная анизотропия, вносимая молекулами CH_2O , не может заметно повлиять на двойное лучепреломление исследуемых растворов. Таким образом, положительный знак Δn связан с необратимым разрывом водородных связей в макромолекулах. Это подтверждается также температурной зависимостью Δn , полученной нами для раствора нативной ДНК с молекулярным весом 250 000 в воде при $c_{\text{ДНК}} = 0,021 \text{ г}/100 \text{ мл}$. С повышением температуры отрицательное значение Δn переходит через нуль и становится положительным при 70° . После охлаждения Δn снова приобретает отрицательный знак *.

* В случае раствора ДНК молекулярного веса $18 \cdot 10^6$ при концентрации $c_{\text{ДНК}} = 0,01 \text{ г}/100 \text{ см}^3$ величина Δn отрицательна вплоть до 76° . Это показывает, что температура полной денатурации ДНК зависит от молекулярного веса. Аналогичный вывод был сделан в работе [18].

Рис. 2 и 3 свидетельствуют о значительной роли эффекта макроформы в изучаемых системах. Известно, что при наличии эффекта формы измеряемая величина $[n] = [n]_i + [n]_f + [n]_{fs}$ складывается из трех частей, обусловленных соответственно собственной анизотропией и анизотропией макро- и микроформы. Известно также [1], что $[n]_i / [\eta]$ пропорционально анизотропии сегмента $a_1 - a_2$, которая в свою очередь связана с разностью поляризумостей мономерного звена $a_{\parallel} - a_{\perp}$ и числом мономерных единиц в сегменте S : $a_1 - a_2 = S(a_{\parallel} - a_{\perp})$. Таким образом, сведения о структуре мономера можно получить при помощи величин $[n]_i$ и $[\eta]$.

Отсутствие непосредственных сведений о молекулярных весах образцов не позволяет оценить величины $[n]_f$ и $[n]_{fs}$. Полагая, что первичные структуры ДНК и РНК близки между собой, было изучено

двойное лучепреломление и вязкость растворов РНК из *E. coli* (средний молекулярный вес которой $\approx 1 \cdot 10^6$), прогретых в тех же условиях, но при 70° . Результаты исследований даны на рис. 2 и 3 и табл. 1 и 2.

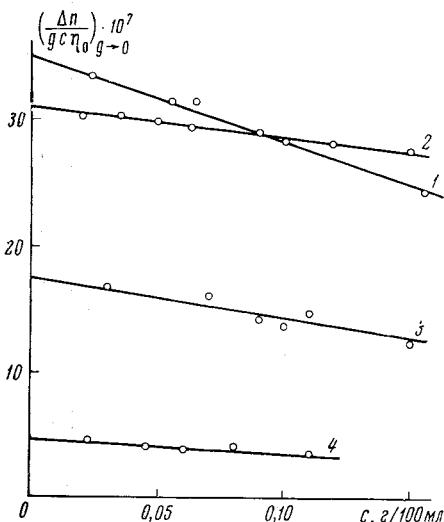


Рис. 2. Концентрационная зависимость двойного лучепреломления растворов ДНК (1—3) и РНК (4), денатурированных при 90, 92, 95 и 70° соответственно в смеси воды и 6% формальдегида

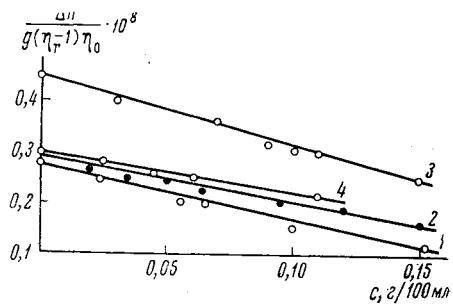


Рис. 3. Зависимость $\Delta n / g (\eta_r - 1) \eta_0 = f(c)$ для растворов ДНК (1—3) и РНК (4), денатурированных при 90, 92, 95 и 70° соответственно в смеси воды с 6% формальдегида

В случае РНК можно считать, что значение M одинаково для нативного и денатурированного образца. Зная M и $[\eta]$ денатурированной РНК в 0,15 растворе NaCl и полагая, что эта система близка к идеальной, мы определили S [19]. Полученное значение $S = 6$, позволяет приписать молекуле денатурированной РНК геометрическую асимметрию, получаемую для гауссовых клубков и вычислить $[n]_f$ [20, 21]. Для вычисления $[n]_{fs}$ [5] необходимо еще найти фактор асимметрии сегмента $(L_2 - L_1)_s$, являющийся однозначной функцией его осевого отношения P_s . Величина $P_s = Sb/d$, где $b \approx 7 \text{ \AA}$ и $d \approx 10 \text{ \AA}$, длина и ширина мономерного звена соответственно.

Зная $[n]_i$ и $[\eta]$, можно было вычислить значение $a_1 - a_2$ [1], а, следовательно и $a_{\parallel} - a_{\perp}$, которое очевидно, является усредненным для четырех оснований цепи РНК. Результаты оценки, приведенные в табл. 2, показывают, что молекула денатурированной РНК обладает небольшой отрицательной собственной анизотропией.

Исходя из предположения о близости первичных структур РНК и ДНК, мы приписали значения $a_{\parallel} - a_{\perp} = -1,7 \cdot 10^{-25} \text{ см}^3$ и $S = 6$ молекуле денатурированной ДНК. Тогда можно было найти $[n]_i$ и $[n]_{fs}$, а следовательно, и $[n]_f$. По значениям $[n]_f$ [20, 21] были вычислены молекулярные веса ДНК, денатурированной при трех температурах (табл. 2).

Сравнение со значением $M = 17,4 \cdot 10^6$ для нативного образца показывает, что нагревание раствора ДНК при 90 и 92° приводит к полному разделянию цепей, а при 95° денатурация сопровождается частичной деструкцией макромолекул. Заметим, что использование найденных таким образом молекулярных весов и измеренных величин $[\eta]$ дает для ДНК, денатурированной при 95° , значение S , совпадающее с найденным для РНК. Несколько большее значение ($S \approx 10$) получается для двух других образцов ДНК. Это вызвано некоторым несоответствием в величинах M и $[\eta]$.

Таблица 2

Характеристические значения двойного лучепреломления, вязкости и оптическая анизотропия нуклеиновых кислот в денатурированном состоянии
($S = 6$; $(a_1 - a_2) \cdot 10^{25} = -10 \text{ см}^3$; $(a_{\parallel} - a_{\perp}) \cdot 10^{25} = -1,7 \text{ см}^3$)

Образец	Температура денатурации, $^\circ\text{C}$	$M \cdot 10^{-6}$	$[\eta] \cdot 10^{-2}$, мл/г	$[n] \cdot 10^7$	$[n]_f \cdot 10^7$	$[n]_{fs} \cdot 10^7$	$[n]_i \cdot 10^7$
ДНК	90	8,6	12,5	35	16,5	19,4	-0,9
ДНК	92	7,0	11,9	31	13,5	18,4	-0,9
ДНК	95	5,8	3,8	17	11,4	5,9	-0,3
РНК	70	1,0	1,5	4,5	1,9	2,7	-0,1

Зная анизотропию мономерного звена молекулы денатурированной ДНК или РНК, можно оценить степень заторможенности вращения боковой группы относительно основной цепи, аналогично тому, как это сделано в работе [22] для полистирола: $a_{\parallel} - a_{\perp} = \Delta a_1 + \Delta a_2 - \frac{3}{2} \Delta a_2 \sin^2 \psi$, где Δa_1 — разность поляризумостей связей основной цепи мономерного звена; Δa_2 — максимальное значение разности поляризумостей бокового основания; ψ — угол между направлением главной цепи и нормалью к плоскости боковой группы. Такая оценка возможна ввиду сходства структур рассматриваемых макромолекул. Подставляя для ДНК значения Δa_1 , Δa_2 , $a_{\parallel} - a_{\perp}$, получим: $-1,7 \cdot 10^{-25} = 30 \cdot 10^{-25} - 90 \cdot 10^{-25} + \frac{3}{2} 90 \cdot 10^{-25} \sin^2 \psi$, откуда $\psi = 41^\circ$. Заметим, что для атактического полистирола $\psi = 38^\circ$. Таким образом, степень заторможенности боковых циклических оснований в молекуле полностью денатурированной ДНК или РНК близка к заторможенности бензольных колец в молекуле атактического полистирола. Естественно, что этот результат не означает, что пуриновые и пиримидиновые основания обладают одинаковой гибкостью. При оценке ψ мы использовали усредненные значения разности поляризумостей боковой группы и, следовательно, получили среднее значение ее заторможенности вращения относительно основной цепи.

Таким образом, из приведенных результатов следует, что молекула денатурированной ДНК и РНК как по гидродинамическому, так и по оптическому поведению хорошо аппроксимируется статистическим клубком.

Выводы

Изучено динамическое двойное лучепреломление, вязкость и оптическая плотность при $\lambda = 260 \text{ мкм}$ растворов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в зависимости от условий тепловой денатурации.

Анализ экспериментальных данных позволяет предположить, что прогревание растворов малой концентрации ДНК в воде при 100° с последующим охлаждением и добавлением NaCl до концентрации $0,15 M$ приводит к образованию однотяжных нитей с внутримолекулярными водородными связями.

Если прогревание растворов нуклеиновых кислот ведется в присутствии формальдегида, то получаемые при охлаждении и добавлении NaCl

макромолекулы как по оптическим, так и по гидродинамическим свойствам хорошо аппроксимируются гауссовым клубком, лишенным водородных связей.

Физический институт
Ленинградского государственного
университета
Институт цитологии АН СССР

Поступила в редакцию
4 VII 1966

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Kuhn, H. Kuhn, *Helv. chim. acta*, **26**, 1394, 1943.
2. R. Cergf, *J. Phys. Rad.*, **19**, 122, 1958.
3. B. Zimm, *J. Chem. Phys.*, **24**, 269, 1956.
4. В. Н. Цветков, Э. В. Фрисман, О. Б. Птицын, С. Я. Котляр, *Ж. техн. физики*, **28**, 1428, 1958.
5. В. Н. Цветков, Высокомолек. соед., **5**, 740, 1963.
6. Э. В. Фрисман, В. И. Воробьев, Л. В. Щагина, Н. К. Яновская, Высокомолек. соед., **4**, 762, 1962.
7. Э. В. Фрисман, М. А. Сибилева, А. В. Красноперова, Высокомолек. соед., **1**, 597, 1959.
8. Э. В. Фрисман, В. Н. Цветков, *J. Polymer Sci.*, **30**, 297, 1958.
9. J. Eigner, P. Doty, *J. Molek. Biol.*, **12**, 549, 1965.
10. Э. В. Фрисман, В. И. Воробьев, Л. В. Щагина, Высокомолек. соед., **6**, 884, 1964.
11. Э. В. Фрисман, Л. В. Щагина, В. И. Воробьев, *Biorheology*, **2**, 189, 1965.
12. J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **171**, 964, 1953.
13. F. H. C. Crick, J. D. Watson, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **A223**, 80, 1954.
14. J. E. Eigner, Doctoral thesis, Harvard University, 1960.
15. A. Peterlin, *J. Polymer Sci.*, **12**, 45, 1954.
16. Л. П. Гаврилова, А. С. Спирин, А. Н. Белозерский, Докл. АН СССР, **126**, 1121, 1959.
17. А. С. Спирин, Л. С. Мильман, Докл. АН СССР, **134**, 717, 1960.
18. A. R. Placocke, I. O. Wacker, *J. Molek. Biol.*, **5**, 564, 1962.
19. P. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, N. Y., 1953.
20. В. Н. Цветков, Э. В. Фрисман, Докл. АН СССР, **97**, 647, 1954.
21. Э. В. Фрисман, Диссертация, 1964.
22. Т. М. Бирштейн, Диссертация, 1960.

THE EFFECT OF THERMAL DENATURATION CONDITIONS
ON OPTICAL AND HYDRODYNAMIC PARAMETERS
OF NUCLEIC ACID MOLECULES

E. V. Frisman, L. V. Shchagina, V. I. Vorob'ev

Summary

Dynamic birefringence, viscosity and optical density at $\lambda = 260$ mmk of DNA molecules has been measured in dependence on denaturation conditions. Heating of diluted DNA aqueous solutions at 100°C with following cooling and addition of NaCl up to 0.15 M solution brings rising of single threads with intramolecular hydrogen bonds. Heating of DNA solutions in presence of formaldehyde with following cooling and NaCl addition gives molecules well approximated with gaussian coil without hydrogen bonds on optical and hydrodynamic behaviour.