

УДК 541(64+49):539.77

КОМПЛЕКСЫ ДНК-ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНОЕ ВЕЩЕСТВО, РАСТВОРИМЫЕ В МАЛОПОЛЯРНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ¹

© 1997 г. В. Г. Сергеев, О. А. Пышкина, А. Б. Зезин, В. А. Кабанов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Химический факультет
119899 Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 08.08.96 г.

Принята в печать 22.08.96 г.

Показана возможность растворения линейной высокомолекулярной ДНК в безводных малополярных органических растворителях путем ее комплексования с катионными поверхностно-активными веществами. Методами скоростной седиментации, УФ-спектроскопии и спектрофотометрии кругового дихроизма установлено, что комплексы ДНК с цетилтриметиламмоний бромидом и дистеарилдиметиламмоний хлоридом в хлороформе, гептане и циклогексане представляют собой индивидуальные соединения состава 1 : 1. При этом ДНК, переведенная в органическую фазу, сохраняет конформацию двойной спирали. Исследована устойчивость стехиометрического комплекса ДНК (300–500 пар оснований)–дистеарилдиметиламмоний хлорид в водно-солевой среде. Показана возможность переноса этого комплекса через границу раздела фаз вода–хлороформ и хлороформ–0.5 М водный раствор NaCl.

В работах [1–3] показано, что стехиометрические комплексы, образованные гибкоцепными полионами и противоположно заряженными ПАВ, способны растворяться в органических растворителях с низкой диэлектрической постоянной. Недавно мы показали [4], что последнее справедливо также и для высокомолекулярной линейной ДНК. Иными словами, продемонстрирована возможность растворения высокомолекулярной ДНК в сухих малополярных органических растворителях путем ее комплексования с катионными ПАВ.

В настоящей работе получены стехиометрические комплексы различных ДНК с катионными ПАВ и изучено их поведение в малополярных органических средах, а также в двухфазных системах типа масло–вода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ДНК из эритроцитов цыплят "Союзхимреактив" (800–3000 пар оснований, $M = (0.5–2) \times 10^6$) (ДНК-1), ДНК из спермы лосося "ГОСНИИОХТ" (300–500 пар оснований, $M = (1.9–3.2) \times 10^5$) (ДНК-2) и синтетический гетерогенный 14-звенный ДНК-дуплекс². Нативные препараты ДНК очищали от примеси белка по ме-

тодике [5]. В качестве ПАВ применяли цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) и дистеарилдиметиламмоний хлорид (ДСДАХ) ("Tokyo Kasei Kogyo Co"). Хлороформ, гептан и циклогексан (х. ч.) очищали от следовых количеств воды над молекулярными ситами 5 Å. Растворителем служила дистилированная вода (дополнительно очищенная с помощью системы "Milli-Q" ("Millipore", США)), низкомолекулярной солью – NaCl (ч. д. а.). Все эксперименты выполняли при pH 8.0 (0.5 М ТВЕ-буфер). Седиментационные исследования проводили на аналитической ультрацентрифуге "Beckman-E" (США) при скорости вращения ротора $\omega = 48000$ и 60000 об/мин и температуре 20°C. Седиментационные профили регистрировали по изменению оптической плотности растворов при $\lambda = 260$ нм.

Комплексы ДНК–ПАВ получали в микропробирках (аппендорфах) смешением водных растворов ДНК концентрации 10–20 мкг/мл (что соответствует концентрации нуклеотидных звеньев $(3–6) \times 10^{-5}$ моль/л) и ДСДАХ или ЦТАБ, взятых в эквимольном количестве по отношению к фосфатным группам ДНК, при 20°C. Полученные осадки комплексов ДНК–ПАВ отделяли от супернатанта центрифугированием на препаративной центрифуге "Elmi" при 12000 об/мин, после чего их декантировали и сушили в вакуумном эксикаторе над хлоридом кальция в течение 7–10 дней до постоянной массы. Высушенные образцы помещали в органический растворитель (хлороформ, циклогексан или гептан). Концентрацию комплекса ДНК–ПАВ, перешедшего в органический растворитель, определяли спектрофотометрически

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 96-03-33522а).

² ДНК-дуплекс был синтезирован на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ в лаборатории З.А. Шабаровой и любезно предоставлен нам для проведения исследований.

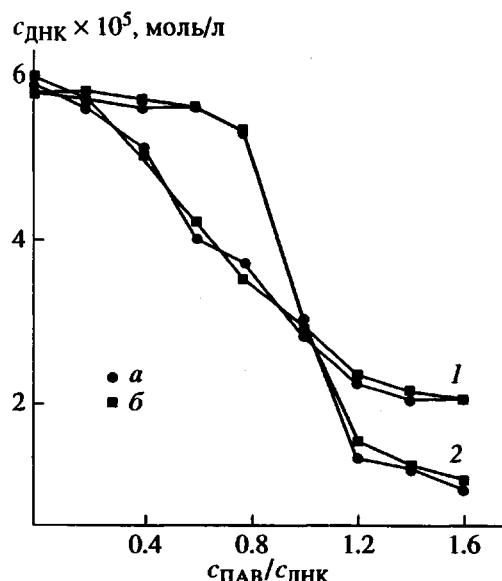


Рис. 1. Зависимость остаточной концентрации ДНК-1 (а) и ДНК-2 (б) в надосадочной жидкости после отделения стехиометричного комплекса ДНК-ПАВ от соотношения концентраций ДНК и ПАВ: 1 – ДСДАХ, 2 – ЦТАБ. Концентрация ДНК 20 мкг/мл, $T = 20^\circ\text{C}$.

при длине волны 260 нм, используя спектрофотометр "Specord M-40" (Германия).

Спектры кругового дихроизма (КД) в области 240–310 нм получали на спектрополяризаторе "JASCO J-500 C" (Япония) в 1 см кювете при температуре 20°C . Величину Δe рассчитывали, выразив концентрацию ДНК или комплекса ДНК-ПАВ в молях нуклеотидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При титровании водного раствора ДНК водным раствором ПАВ происходит осаждение комплексов ДНК-ПАВ. Зависимости остаточной концентрации ДНК в надосадочной жидкости после отделения комплекса на центрифуге от соотношения концентраций ПАВ и ДНК представлены на рис. 1. Как видно из кривой 1, связывание ДНК с более гидрофобными ионами ДСДАХ начинается уже при очень низких концентрациях ПАВ в растворе ($\sim 10^{-6}$ моль/л). В области достоверных измерений содержание ДНК в супернатанте уменьшается практически линейно с увеличением количества добавленного ДСДАХ. При соотношении ДНК и ДСДАХ, близких к эквимольному, практически вся ДНК переходит в нерастворимый комплекс. Следовательно, состав образующихся комплексов ДНК-ДСДАХ не зависит от соотношения концентраций исходных реагентов и близок к 1 : 1 (стехиометричный комплекс). На рис. 1 приведена также кривая 2 осаждения ДНК раствором ЦТАБ. В случае относительно менее ги-

дрофобного ЦТАБ связывание ДНК в комплексы начинается лишь после достижения некоторой критической концентрации ПАВ (кривая 2). При этом так же, как и в случае ДСДАХ, практически полное осаждение ДНК из раствора наблюдается при эквимольном соотношении ДНК и ЦТАБ. Следует заметить, что при соотношениях ПАВ/ДНК > 1 в надосадочной жидкости обнаруживается заметное количество ДНК, не перешедшей в осадок. Это обусловлено недостаточно эффективным режимом центрифугирования используемой в работе препаративной центрифуги "Elmi", при котором не удается отделить высокодисперсную фракцию комплекса ДНК-ПАВ. Полностью осадить эту фракцию удается в аналитической центрифуге "Вескман-Е" при скорости вращения ротора 25000 об/мин. Центрифугирование системы ДНК-ПАВ при соотношении компонентов 1 : 1 при таком режиме показывает, что уже на разгоне весь комплекс осаждается и после установления заданного режима центрифугирования 60000 об/мин (в течение 10 мин) в ячейке не обнаруживаются молекулы ДНК. Это однозначно свидетельствует, что реакция между ДНК и ПАВ действительно завершается образованием стехиометричного комплекса.

Комpleксы ДНК-ПАВ, включающие эквимольные количества звеньев ДНК и катионов ПАВ, как и комплексы других полионов с противоположно заряженными ПАВ, не растворяются в воде, поскольку ионогенные группы в них экранированы от молекул воды гидрофобными фрагментами ПАВ. Образование таких комплексов обусловлено электростатическим взаимодействием фосфатных групп ДНК с противоионами ПАВ. Важную роль в стабилизации комплексов ДНК-ПАВ в водных средах играют гидрофобные взаимодействия углеводородных радикалов ПАВ внутри частиц комплекса. Стехиометричные комплексы ДНК-ПАВ, полученные, как описано выше, исследовали на растворимость в малополярных органических растворителях – хлороформе, гептане и циклогексане. Оказалось, что комплексы высокомолекулярных образцов ДНК с ДСДАХ и ЦТАБ, помещенные в указанные растворители, через несколько часов переходят в раствор. Следует отметить, что полное растворение достигается только для тщательно высущенных образцов. Наряду с этим стехиометричные комплексы низкомолекулярного ДНК-дуплекса как с ЦТАБ, так и с ДСДАХ оказались не растворимы даже в хлороформе – самом полярном из использованных нами растворителей. Такой, на первый взгляд, парадоксальный результат, возможно, объясняется заметным вкладом гидрофильных торцов относительно коротких молекул дуплекса в липофильно-липофобный баланс комплексов.

Полученные растворы исследовали методом седиментации. Флотационные профили для растворов в хлороформе, относящиеся к различной

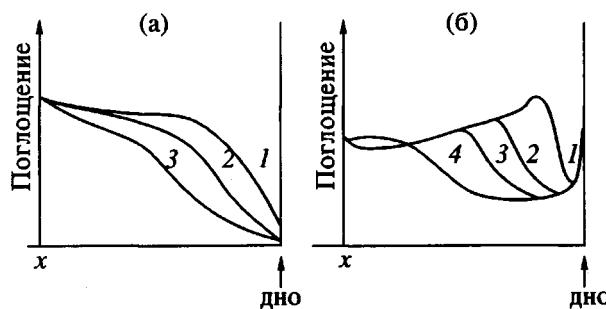


Рис. 2. Флотационные профили комплексов ДНК-ДСДАХ в хлороформе при различной продолжительности центрифугирования. а: ДНК-1, время центрифугирования 2 (1), 13 (2) и 26 мин (3), $\omega = 40000$ об/мин; б: ДНК-2, время центрифугирования 4 (1), 12 (2), 17 (3), 29 мин (4), $\omega = 60000$ об/мин. $T = 20^\circ\text{C}$.

продолжительности центрифугирования, приведены на рис. 2. Видно, что во всех случаях на седиментограммах наблюдается только одна ступенька, соответствующая комплексу постоянного состава. Поскольку ДНК в отсутствие ПАВ не растворяется в хлороформе, из приведенных данных следует, что комплексы ДНК-ДСДХ не диссоциируют на исходные компоненты, т.е. присутствуют в растворе в виде устойчивого индивидуального соединения. Аналогичные данные получены и для комплексов ДНК-ЦТАБ.

Одной из важнейших характеристик растворов нуклеиновых кислот и полинуклеотидов, отражающей конформационное состояние ДНК в водных растворах, является спектр поглощения в УФ-области. На рис. 3 представлены спектры поглощения комплексов ДНК-ДСДАХ в хлороформе (кривые 1 и 2). Для сравнения приведен спектр исходной ДНК в воде (кривая 3). Видно, что при замене водной среды на органическую существенных изменений в спектрах поглощения не происходит. Для всех спектров наблюдается максимум поглощения в области 260 нм. Коэффициент экстинции в обоих случаях составляет $6500 - 6700$ моль⁻¹ см⁻¹. Аналогичные спектры характерны и для комплексов ДНК-ЦТАБ. УФ-спектры комплексов ДНК-ДСДАХ и ДНК-ЦТАБ в гептане и циклогексане идентичны спектрам в хлороформе.

На рис. 4 приведены спектры кругового дихроизма для комплексов ДНК-ДСДАХ в хлороформе (кривые 1 и 2) и исходной нативной ДНК в воде, молекулы которой находятся в В-форме (кривая 3). Видно, что в спектрах комплексов проявляются характерные черты спектра нативной ДНК в конформации закрученной двойной спирали [6]. Для комплекса наиболее высокомолекулярной ДНК-1 характерна длинноволновая положительная полоса с максимумом около 280 нм и мольным дихроизмом меньше двух, а также интенсивная коротковолновая отрицательная полоса с

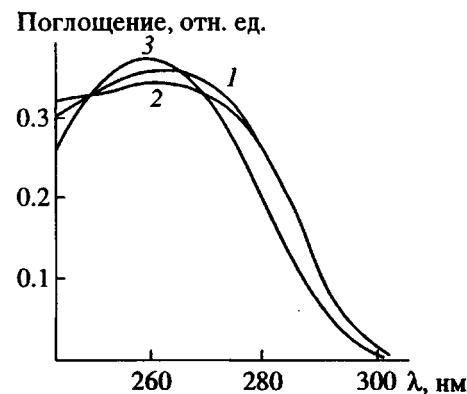


Рис. 3. УФ-спектры стехиометрических комплексов ДНК-ДСДАХ в хлороформе: 1 – ДНК-1, 2 – ДНК-2, 3 – исходная ДНК в 0.5 М ТВЕ-буфере. Концентрация ДНК 20 мкг/мл, $T = 20^\circ\text{C}$.

минимумом при 240 нм. Точка инверсии ($\Delta\epsilon = 0$) лежит в области 270 нм. Аналогичные спектры КД наблюдали для сильно компактизованных нукleinовых кислот, находящихся в головках фагов [7]. В спектре комплекса ДНК-2, имеющей несколько меньшую молекулярную массу, проявляются характерные черты спектра нативной ДНК в А-форме. В нем присутствует интенсивная длинноволновая положительная полоса с максимумом около 270 нм и коротковолновая отрицательная полоса с минимумом при 240 нм. Точка инверсии ($\Delta\epsilon = 0$) лежит в области 255 нм. А-форма, как известно [6], отличается от В-формы несколько большей закрученностью двойной спирали. Таким образом, комплексообразование ДНК с противооположно заряженными ПАВ и перевод этих комплексов в малополярные органические растворители не приводит к разрушению двойной спирали, т.е. вторичной структуры, характерной для нативной ДНК.

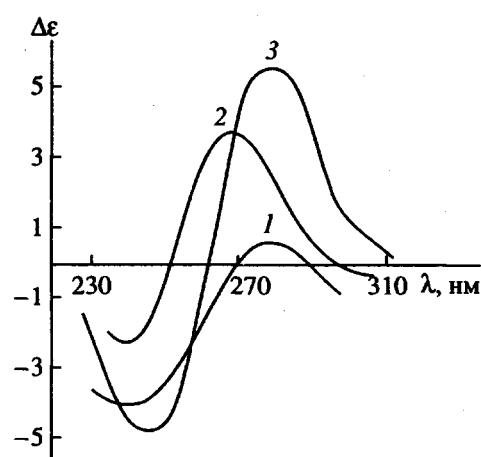


Рис. 4. КД-спектры комплексов ДНК-ДСДАХ в хлороформе: 1 – ДНК-1, 2 – ДНК-2, 3 – исходная ДНК в 0.5 М ТВЕ-буфере.

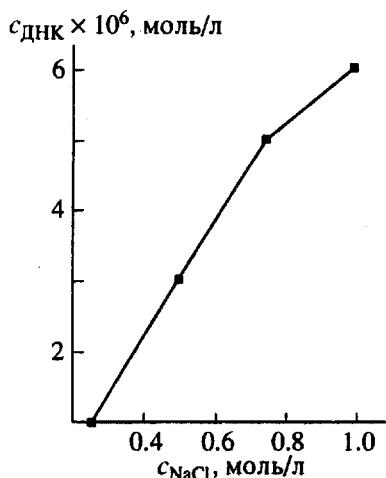


Рис. 5. Диссоциация комплекса ДНК-2-ДСДАХ в растворе NaCl различной концентрации. $T = 20^\circ\text{C}$.

Спектры КД не содержат прямой информации о третичной структуре ДНК в комплексах с катионными ПАВ. Однако, недавно, методом флуоресцентной микроскопии установлен факт резкой компактизации молекул ДНК при образовании таких комплексов в водном растворе [8, 9]. Позднее мы показали также, что компактная конформация сохраняется и при переводе комплекса ДНК-ПАВ в малополярные органические растворители [10].

Известно, что комплексы полианион-ПАВ в водных средах диссоциируют на исходные компоненты при добавлении определенных количеств низкомолекулярной соли [11]. Мы убедились, что последнее справедливо и для комплексов ДНК-ПАВ. Для этого к сухому водонерастворимому комплексу ДНК-2-ДСДАХ, полученному смешением водных растворов, содержащих заданные количества ДНК и ПАВ в соотношении 1 : 1, добавляли 0.5 мл раствора NaCl различной концентрации. Через 48 ч (время, достаточное для установления равновесия) спектрофотометрически определяли количество перешедшей в водную фазу ДНК. Соответствующая зависимость представле-

на на рис. 5. Видно, что при концентрациях NaCl, превышающих 0.25 моль/л, ДНК начинает переводить в водно-солевой раствор в результате диссоциации комплекса. Количество ДНК в растворе увеличивается с повышением содержания NaCl в исследуемой системе. В этой связи представляло интерес выяснить возможность диссоциативного переноса ДНК из раствора ее комплекса с катионным ПАВ в органическом растворителе в водную фазу, содержащую низкомолекулярную соль.

Исследование проводили следующим образом. В микропробирку помещали 0.5 мл раствора ДНК заданной концентрации в 0.5 М ТВЕ-буфере. Туда же добавляли 1 мл хлороформа. В полученную двухфазную систему вводили различные количества ПАВ. Смесь интенсивно перемешивали в течение 5 мин, центрифугировали, а затем спектрофотометрически определяли содержание ДНК в органической и водной фазах.

Оказалось, что комплексы высокомолекулярной ДНК-1, образующиеся в водной фазе, в органическую фазу не переходят, а концентрируются на межфазной границе. В отличие от этого комплексы менее высокомолекулярной ДНК-2 с ДСДАХ (но не с ЦТАБ) переходят из водной фазы в органическую. На рис. 6 представлены зависимости концентрации ДНК в органической (кривая 1) и водной фазах (кривая 2) от исходных соотношений ДСДАХ : ДНК-2 в водной фазе. Видно, что убыль ДНК в воде соответствует ее накоплению в хлороформе. При добавлении 1.5-кратного избытка ДСДАХ практически вся ДНК оказывается в органической фазе.

Замечательно, что добавлением NaCl в водную фазу можно вызвать обратный перенос ДНК из органической фазы в водную. Это было показано следующим образом. Слой органической фазы в микропробирке, содержащий различные количества растворенного комплекса ДНК-ДСДАХ, отделяли от водного слоя и смешивали с 0.5 мл 0.5 М NaCl. Смесь интенсивно перемешивали в течение 5 мин, разделяли центрифугированием и вновь определяли содержание ДНК в каждой из фаз. Результаты приведены ниже

9×10^{-6}	1.8×10^{-5}	2.4×10^{-5}	3.0×10^{-5}
3.0×10^{-6}	3.0×10^{-6}	3.0×10^{-6}	3.0×10^{-6}

Следует подчеркнуть, что предложенный на-
ми способ перевода ДНК в малополярные органи-
ческие растворители принципиально отличается
от описанной ранее [12] солюбилизации нуклеино-
вых кислот в обращенных мицеллах, где макромо-
лекулы, переходя в органическую фазу, тем не ме-
нее остаются в водном микроокружении.

Некоторое время назад появилось краткое со-
общение [13] о растворимости комплексов ДНК с

Исходная концентрация ДНК-2 в хлороформе, моль/л
Равновесная концентрация ДНК-2 в водной фазе, моль/л

Видно, что в изученных системах, действи-
тельно происходит обратный перенос ДНК из
хлороформа в водно-солевой раствор. При этом
количество перешедшей ДНК не зависит от исход-
ной концентрации ее комплекса в органическом
растворителе. Можно полагать, что концентрация
ДНК, перешедшей в водную фазу, определяется
содержанием в ней низкомолекулярных ионов, вы-
зывающих диссоциацию комплекса ДНК-ДСДАХ
на исходные компоненты.

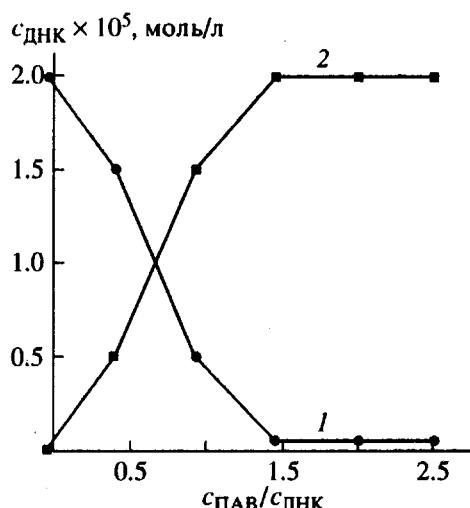


Рис. 6. Зависимость количества ДНК-2 в водной фазе (1) и в хлороформе (2) от соотношения концентраций ДСДАХ и ДНК-2 в водной фазе (0.5 М ТБЕ-буфер). $T = 20^\circ\text{C}$.

катионными амифилами в органических средах. Однако отсутствие каких-либо данных о молекулярных характеристиках использованной ДНК затрудняет интерпретацию результатов [13]. Из данных, описанных выше, следует, в частности, что растворимость комплексов и их поведение в водно-органических средах решающим образом зависит от молекулярной массы ДНК.

В заключение следует отметить, что перевод ДНК в органическую фазу открывает новые возможности для осуществления ее химической модификации с использованием реагентов, неприменимых в водной среде. Кроме того, поскольку состояние ДНК в этих условиях в какой-то мере моделирует ее состояние в липидном бислое, перевод ДНК в органические растворители открывает новые пути для моделирования отдельных

стадий трансмембранных переноса нуклеиновых кислот. В качестве одной из таких моделей можно рассматривать описанный выше диссоциативный перенос комплексов ДНК-ПАВ из хлороформа в водно-солевой раствор.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакеев К.Н., Ян Мин Шу, Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. РАН. 1993. Т. 332. № 4. С. 450.
2. Bakeev K.N., Chugunov S.A., Teraoka I., MacKnight W.J., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Macromolecules. 1994. V. 27. № 14. P. 3926.
3. Kabanov A.V., Sergeev V.G., Foster M.S., Kasaikin V.A., Levashov A.V., Kabanov V.A. // Macromolecules. 1995. V. 28. № 10. P. 3657.
4. Пышкина О.А., Сергеев В.Г., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. РАН. 1996. Т. 348. № 4. С. 496.
5. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
6. Ivonov V.I., Minchenkova L.E., Schyolkina A.K., Poltaev A.I. // Biopolymers. 1973. V. 12. P. 89.
7. Karasev A.V., Dobrov E.N. // Int. J. Biol. Macromol. 1988. V. 10. P. 227.
8. Mel'nikov S.M., Sergeyev V.G., Yoshikawa K. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. № 9. P. 2401.
9. Mel'nikov S.M., Sergeyev V.G., Yoshikawa K. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. № 40. P. 9951.
10. Пышкина О.А., Сергеев В.Г., Лезов А.В., Мельников А.Б., Рюмцев Е.И., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. РАН. 1996. Т. 349. № 6. С. 772.
11. Хандурина Ю.В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. 1994. Т. 36. № 2. С. 241.
12. Imre V.E., Luisi P.L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 107. № 2. P. 538.
13. Ijiro K., Okahata Y. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1992. № 18. P. 1339.

DNA-Surfactant Complexes Soluble in Low-Polarity Organic Liquids

V. G. Sergeev, O. A. Pyshkina, A. B. Zezin, and V. A. Kabanov

Department of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia

Abstract—A linear high-molecular-mass DNA can dissolve in non-aqueous low-polarity organic solvents by forming complexes between DNA and cationic surfactants. The data of high-rate sedimentation, UV spectrometric, and circular dichroism measurements show that the DNA complexes with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and distearoyldimethylammonium chloride (DSDAC) in chloroform, heptane, and cyclohexane are individual compounds with a 1 : 1 stoichiometry. The DNA molecules passing to the organic phase retain a double-stranded helix conformation. Stability of a stoichiometric complex between DNA (300–500 bp) and DSDAC was studied in an aqueous medium. It was demonstrated that this complex can be transferred through a water-chloroform and 0.5 M aqueous NaCl-chloroform phase boundaries.