ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, Серия А, 2003, том 45, № 7, с. 1104–1108

УДК 541.64:539.2

ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ И СТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ ТОНКИХ ПЛЕНОК ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2003 г. А. Е. Грищенко, М. А. Цыбра, Г. К. Юмагужин

Научно-исследовательский институт физики им. В.А. Фока Санкт-Петербургского государственного университета 198504 Санкт-Петербург, Петродворец, Ульяновская ул., 1

Поступила в редакцию 23.07.2002 г.
Принята в печать 27.02.2003 г.

Методом наклонного поляризованного луча исследованы зависимости коэффициента поверхностного двойного лучепреломления B тонких пленок ДНК от толщины пленок и температуры. Определены параметры ориентационного порядка молекул ДНК в поверхностных слоях (S = –0.28) и толщины оптически анизотропных слоев (H_0 > 0.007 мм). Показано, что фрагменты цепных молекул ДНК ориентируются преимущественно параллельно относительно поверхности пленок. Обнаружены существенные зависимости параметра B от температуры. Показано, что эти эффекты связаны с денатурацией и ренатурацией молекул ДНК при термическом воздействии.

Интерес к исследованиям молекулярного строения ДНК вытекает не только из весьма важных биологических функций этих молекул, но и из того, что молекула ДНК является прекрасной моделью макромолекулы, способной к сложным внутримолекулярным структурным переходам. Несмотря на интенсивные многолетние исследования, все еще остается огромное количество нерешенных проблем в этой области макромолекулярной и биологической физики [1–4].

Большой интерес в изучении структуры двухспиральной молекулы ДНК представляют процессы денатурации, ренатурации и самоорганизации молекул в условиях различных изменений параметров окружающей среды.

Настоящая работа посвящена изучению поведения ДНК в поверхностных слоях тонких пленок методом наклонного поляризованного луча.

МЕТОДИКА И ОБРАЗЦЫ

Метод наклонного поляризованного луча [5, 6] основан на измерении оптической разности фаз, создаваемой полимерной пленкой при прохождении через нее поляризованного светового луча под различными углами i между этим лучом и нормалью к пленке. Возникающая разность фаз δ является следствием наличия ориентационного порядка молекулярных цепей относительно поверхности пленок. Упорядоченное расположение фрагментов цепных молекул относительно поверхности пленок количественно можно охарактеризовать параметром ориентационного порядка [5]

$$S = \frac{1}{2}(3\cos^2\vartheta - 1), \qquad (1)$$

где ϑ – угол между направлением фрагментов цепной молекулы и нормалью к поверхности пленки.

При наличии ориентационной упорядоченности цепных молекул относительно поверхности ($S \neq 0$) пленка проявляет оптическую анизотропию при наклонном прохождении через нее поляризованного луча. В случае планарного ориентационного порядка молекулярных цепей $0 > S \geq -\frac{1}{2}$, а в случае гомеотропной ориентации $1 \geq S > 0$. Если в пленке отсутствует преимущественная ориентация анизотропных элементов относительно поверхности, то $\overline{\cos^2\vartheta} = \frac{1}{3}$ и $S = 0$.

E-mail: a.grishchenko@mail.ru (Грищенко Алексей Елисеевич).

Зависимость между возникающей разностью фаз и углом падения i имеет вид

$$\delta = B(1 - \cos 2i) \quad (2)$$

Здесь B – коэффициент поверхностного ДЛП, равный [7]

$$B = B_0(1 - e^{-H/H_0}) = \\ = -\frac{\pi N_A \rho (a_\parallel - a_\perp)}{n^3 \lambda} \frac{}{M_0} \left(\frac{n^2+2}{3}\right)^2 S_0 H_0 (1 - e^{-H/H_0}), \quad (3)$$

где N_A – число Авогадро, n – показатель преломления полимера, λ – длина волны света, $(a_\parallel - a_\perp)$ – разность главных поляризуемостей мономерного звена, M_0 – ММ мономерного звена, ρ – плотность полимера, H – толщина пленки, H_0 – эффективное значение толщины оптически анизотропного поверхностного слоя, S_0 – параметр порядка молекулярных цепей вблизи поверхности пленки.

Видно, что при $H \ll H_0$ коэффициент поверхностного ДЛП пропорционален толщине пленки

$$B = \frac{B_0}{H_0} H \quad (4)$$

Оптическую разность фаз δ, создаваемую пленками, измеряли визуально с использованием компенсатора Брейса. При этом $\delta = \delta_0 \sin 2\Delta\varphi$ (δ_0 – разность фаз в радианах, создаваемая компенсатором, $\Delta\varphi = \varphi - \varphi_0$ – разность отчетов лимба под произвольным углом i и под углом $i = 0$).

Исследовали пленки ДНК, полученные из водных растворов методом испарения на стеклянных подложках при комнатной температуре. Толщину пленок изменяли подбором концентраций растворов. Концентрацию ДНК в растворе варьировали в диапазоне 0.14–0.24%. Относительная влажность воздуха составляла 70%, температура 18°C.

В работе использовали коммерческий препарат высокомолекулярный ДНК (натриевая соль) эритроцитов цыплят фирмы "Reanal" (Будапешт, Венгрия). Соотношение N/P ~ 1.6–1.7; содержание воды не более 20%, белка – не более 1%.

ММ образца ДНК оценивали по экспериментальному значению характеристической вязкости $[\eta]$ с использованием формулы Доти $[\eta] = 1.05 \times 10^{-7} M^{1.32}$ [8]; она оказалась равной ~8×10^5.

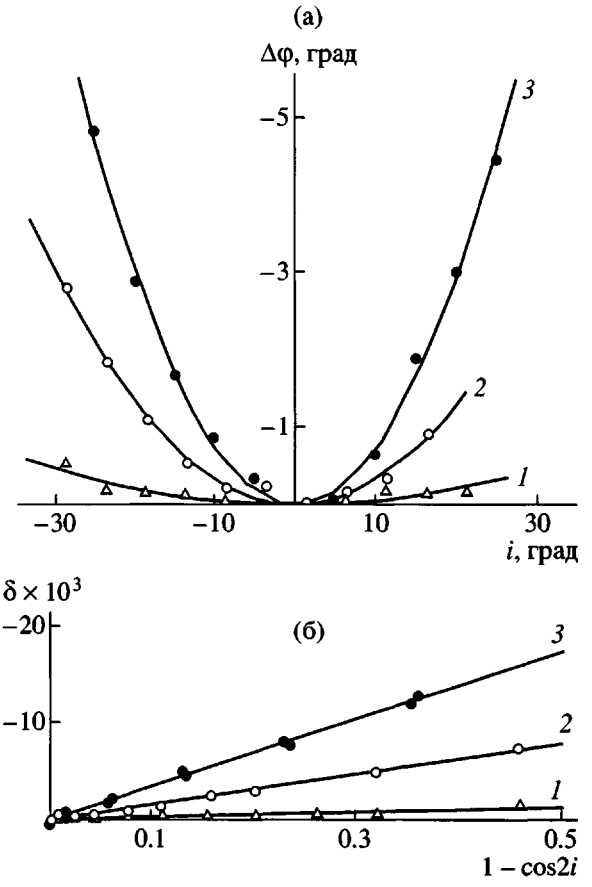

Рис. 1. Зависимости $\Delta\varphi$ от угла падения i (а), а также δ от $1 - \cos 2i$ (б) пленок ДНК. $H \times 10^4$ = = 0.87 (*1*), 2.8 (*2*) и 3.95 см (*3*).

СТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ

На рис. 1а в качестве примера представлены зависимости оптической разности фаз δ от угла падения i поляризованного света на пленки ДНК различной толщины, а рис. 1б иллюстрирует зависимость δ от $(1 - \cos 2i)$ для тех же пленок. Видно, что оптическая разность фаз между обыкновенным и необыкновенным лучами существенно возрастает с увеличением угла i.

В соответствии с формулой (2) зависимости δ от $(1 - \cos 2i)$ оказались линейными, что позволило все пленки охарактеризовать коэффициентами поверхностного ДЛП B, численно равными тангенсам углов наклонов прямых рис. 1б. Определенные таким образом значения B в зависимости от толщины пленок H представлены на рис. 2. Как видно, экспериментальные значения коэффициентов поверхностного ДЛП B таких пленок

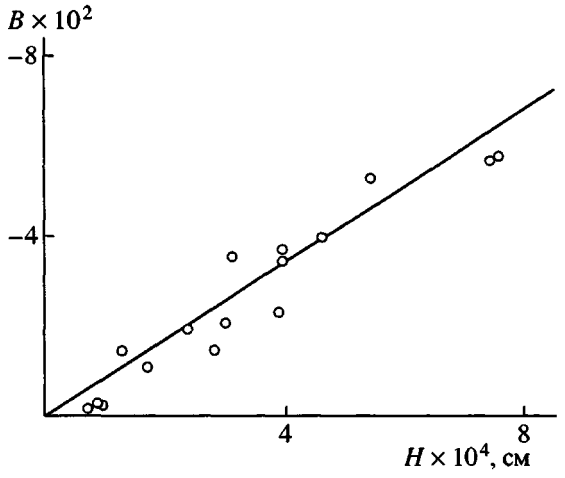

Рис. 2. Зависимость коэффициента поверхностного ДЛП B от толщины пленок ДНК.

ДНК оказались отрицательными по знаку и пропорциональными толщине пленок, в соответствии с теорией (формула (4)).

Последнее обстоятельство позволяет сделать качественную оценку эффективной толщины H_0 оптически анизотропных слоев пленок ДНК. Очевидно, что толщина этого слоя превосходит толщину самой толстой из исследованных пленок $H_0 > 0.007$ мм. Даже из такой заниженной оценки видно, что эта толщина превосходит поперечные размеры молекул ДНК более чем в 3×10^3 раз.

Формулы (3) и (4) позволяют оценить параметр ориентационного порядка фрагментов цепных молекул ДНК относительно поверхности пленок:

$$S_0 = -\frac{9n^3\lambda}{\pi\rho N_A(n^2+2)^2}\frac{M_0}{(a_{\parallel}-a_{\perp})}\frac{dB}{dH} \qquad (5)$$

Здесь $(a_{\parallel}-a_{\perp}) = -67 \times 10^{-25}$ см^3 [9, 10] – оптическая анизотропия мономерного звена ДНК, $n = 1.5$; $\rho = 1.5$ г/см^3; $M_0 = 660$; $dB/dH = -87$ см$^{-1}$ – тангенс угла наклона зависимости B от H (рис. 2).

Определенный таким образом параметр ориентационного порядка оказался равным $S_0 = -0.28$. Отрицательный знак параметра S_0 свидетельствует о том, что средний угол ориентации анизотропных элементов молекул ДНК относительно нормали к поверхности исследованных пленок $\vartheta > 54.7°$, т.е. анизотропные фрагменты молекулярных цепей имеют преимущественно параллельную ориентацию относительно поверхности пленки. Величина S_0, определенная для пленок ДНК, существенно превосходит по абсолютной величине аналогичные значения для гибкоцепных полимеров [5, 6]. Это является следствием большой термодинамической жесткости молекулярных цепей ДНК.

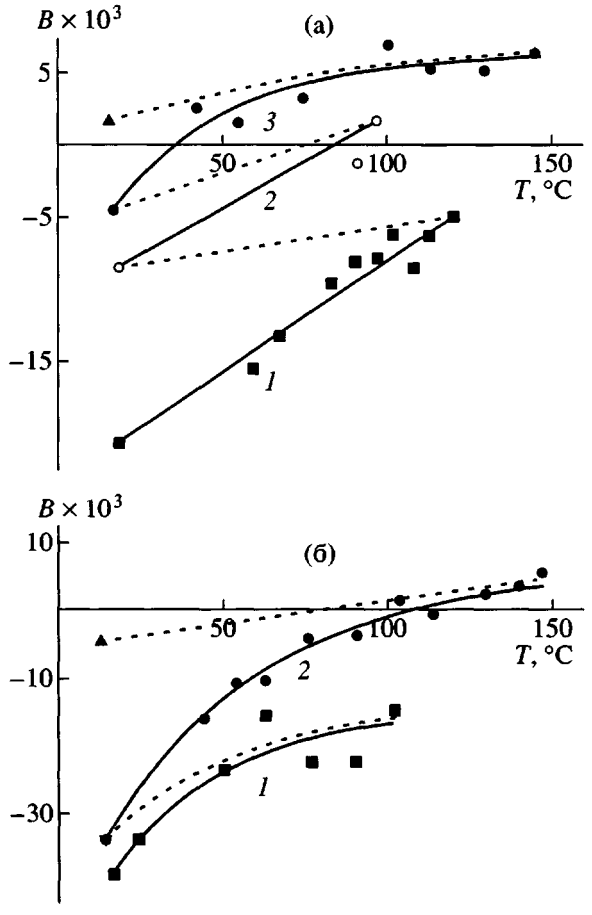

Рис. 3. Температурные зависимости коэффициента поверхностного ДЛП B. $H \times 10^4 = 2.99$ (а) и 5.42 см (б). *1–3* – циклы нагревания и охлаждения; скорость нагревания 0.3 град/мин.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ

На рис. 3а представлена зависимость B от T пленки ДНК толщиной $H = 2.9 \times 10^{-4}$ см. Видно, что при нагревании пленки поверхностное ДЛП уменьшается по абсолютному значению. После охлаждения образца до комнатной температуры эффект ДЛП частично восстанавливается. Аналогичные эффекты наблюдались и во втором цикле нагревания и охлаждения пленки ДНК.

При исследовании третьего цикла нагревания образца была обнаружена даже инверсия знака ДЛП.

Аналогичные характеристики были получены и при изучении температурных зависимостей величины B пленки ДНК толщиной $H = 5.4 \times 10^{-4}$ см. Видно, что при нагревании до 100°С в первом цикле нагревания величина B уменьшается по абсолютной величине в ~2 раза. После охлаждения этой пленки величина поверхностного ДЛП B, характеризующая ориентационный порядок анизотропных элементов молекулярных цепей ДНК в поверхностных слоях, принимает практически то же значение, что и до нагревания. Степень восстановления эффекта ДЛП после охлаждения оказалась равной 85%.

Во втором цикле нагревания до 150°С была обнаружена инверсия знака ДЛП. При 150°С величина B = +0.005 радиан. После охлаждения пленки знак ДЛП вновь изменился, а величина B оказалась равной –0.004 радиан.

Попытка интерпретации обнаруженных эффектов с точки зрения термической деструкции молекулярных цепей ДНК и соответствующего изменения параметра ориентационного порядка не может объяснить всех экспериментально обнаруженных эффектов.

Эти эффекты могут быть объяснены с точки зрения денатурации и частичной ренатурации молекул ДНК в процессе термических воздействий.

Как видно из формулы (3), величина и знак коэффициента поверхностного ДЛП определяется разностью поляризуемостей мономерных единиц $(a_{\parallel} - a_{\perp})$. Сама эта величина является суммой двух вкладов: оптической анизотропии связей, составляющих две молекулярные цепи ДНК, и оптической анизотропии пуриновых и пиримидиновых оснований. При этом первое слагаемое имеет положительный знак, а второе – отрицательный. Последнее обстоятельство есть следствие того, что поляризуемость пуриновых и пиримидиновых оснований вдоль нормали к плоскостям оснований существенно меньше, чем в направлении осей, направленных вдоль плоскостей оснований. Именно этим и определяется суммарный отрицательный знак величины $(a_{\parallel} - a_{\perp})$. При нагревании происходит разрыв межмолекулярных связей, удерживающих цепи друг около друга. Повышение температуры приводит к тому, что все новые участки молекул переходят из спирального состояния в расплавленное. При образовании одиночных фрагментов молекулярных цепей нормали к плоскости оснований получают возможность ориентироваться относительно молекулярных цепей не только параллельно, как в нативном состоянии, но и под любым другим углом, что в принципе может привести к изменению не только величины, но и знака ДЛП, а следовательно, и оптической анизотропии.

Высказанное предположение находится в соответствии с результатами работы [11], в которой было обнаружено существенное уменьшение абсолютных значений оптической анизотропии статистического сегмента ДНК, измеренное методом ДЛП в потоке, с увеличением температуры растворов ДНК.

Наиболее убедительным аргументом в пользу предположения о денатурации и ренатурации молекул в пленках ДНК при их нагревании и охлаждении является обнаруженный в работе эффект инверсии знака ДЛП. Эффекты термодеструкции могли бы привести лишь к изменению величины ДЛП.

Методы исследования денатурации молекул ДНК в водных растворах ограничены верхним пределом температуры (температура кипения воды). Использование метода наклонного поляризованного луча в пленках позволяет расширить температурный диапазон изучения денатурации и ренатурации ДНК. Это определяет важность и актуальность проведенных исследований, так как дает возможность выявить новые закономерности устойчивости генома к воздействию внешних факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Албертс Б., Брей Д., Льис Дж., Рэфер М., Робертс К., Уотсон Дж.* Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994.

2. *Zimmerman S.B., Pfeiffer B.H.* // J. Mol. Biol. 1979. V. 135. P. 1023.

3. *Bradbury E.M., Price W.C., Wilkinson G.R.* // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 301.

4. *Тэнфорд Ч.* Физическая химия полимеров / Под ред. Слонимского Г.Л. М.: Химия, 1965.

5. *Грищенко А. Е.* Механооптика полимеров. СПб.: СПбГУ, 1996.

6. *Грищенко А.Е., Черкасов А.Н.* // Успехи физ. наук. 1997. Т. 167. № 3. С. 269.

7. *Грищенко А.Е., Павлов Г.М., Вихорева Г.А.* // Высокомолек. соед. Б. 1999. Т. 41. № 8. С. 1347.

8. *Doty P., McGill B., Rise S.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1958. V. 44. P. 411.

9. *Цветков В. Н.* Жесткоцепные полимерные молекулы. Л.: Наука, 1986.

10. *Цветков В.Н., Андреева Л.Н., Квитченко Л.Н.* // Высокомолек. соед. 1965. Т. 7. № 11. С. 2001.

11. *Фрисман Э.В., Воробьев В.И., Щагина Л.В., Яновская Н.К.* // Высокомолек. соед. 1962. Т. 4. № 5. С. 762.

Thermal Transitions and Surface Layer Structure of Deoxyribonucleic Acid Thin Films

A. E. Grishchenko, M. A. Tsybra, and G. K. Yumaguzhin

**Research Institute of Physics, St. Petersburg State University, ul. Ulyanovskaya 1, Petrodvorets, 198504 Russia*

Abstract—The surface birefringence B in DNA thin films depending on the film thickness and temperature was studied using the technique of polarized beam at grazing incidence angle. The parameters of orientational order of DNA molecules in surface layers ($S = -0.28$) and thickness of optically anisotropic layers ($H_0 > 0.007$ mm) were determined. It was shown that fragments of DNA chain molecules are primarily oriented along the film surface. The value of B was found to considerably depend upon temperature. It was shown that these effects are due to denaturation and renaturation of DNA molecules upon thermal cycling.