

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ ДНК В ВОДНЫХ  
РАСТВОРАХ КАРБАМИДА

В. М. АСЛАНЯН, Ю. С. БАБАЯН, В. В. САГАТЕЛЯН, М. К. ПОГОСЯН

Добавление в водный раствор ДНК карбамида (1—8 М) приводит к уменьшению положительной полосы в спектре кругового дихроизма (КД)—в молекулах ДНК стимулируются конформационные переходы в пределах В-семейства форм (В→С). Процесс протекает без изменения третичной структуры молекулы ДНК и без образования агрегатов. Показано, что при концентрациях карбамида больше 5 М нарушается характер происходящих конформационных переходов.

Поведение ДНК в водных растворах карбамида исследовалось рядом авторов [1—6]. В некоторых работах [1—3] дестабилизация молекул ДНК в водно-карбамидном растворе объяснялась конкурирующей способностью карбамида образовывать водородные связи с азотистыми основаниями. Помимо этой версии в работе Левина [1] обсуждалась возможность связывания двух цепей ДНК карбамидным мостиком при помощи водородных связей.

Однако из некоторых работ [4—6] следует, что скорее всего карбамид изменяет гидрофобность среды, что должно сопровождаться дестабилизацией молекул ДНК. Независимыми методами показано [5, 6], что конкуренция карбамида за образование водородных связей не может быть основной причиной дестабилизации ДНК.

Настоящая работа посвящена изучению конформационных переходов ДНК в водно-карбамидных растворах. Известно, что молекула ДНК в водных растворах при концентрации противоионов меньше 0,1 М находится в В-форме, которая характеризуется КД спектром с положительной полосой при 280 nm и отрицательной—при 245 nm с примерно одинаковыми амплитудами [7, 8]. Характер изменения спектра КД (амплитуда положительной полосы уменьшается) ДНК в концентрированных солевых растворах и в растворах с высоким содержанием метанола (70—80%) дал возможность сделать вывод, что по мере увеличения концентрации соли и метанола, когда ДНК все еще остается в пределах семейства В-форм, увеличивается угол между соседними парами оснований, и ДНК переходит в более закрученную С или Т форму [7, 8].

*Материал и методика.* ДНК (мол. вес 107) из тямуса теленка, печени крысы были выделены по методу Георгияса, а ДНК фага Т2—фенольным методом. Для всех ДНК  $A_{260/230}$ —лежало между 1,8—2,0, а  $A_{260}/A_{230}$ —между 2,2—2,4. Все образцы

ДНК изучали в цитратно-солевом буфере 1 SSC и 0,1 SSC (1 SSC = 0,15 М NaCl + 0,15 М цитрат Na, pH 7,0). Кривые плавления ДНК и УФ-спектры снимали в термостатируемой ячейке спектрофотометра UNICAM SP-8000 при непрерывном режиме нагрева препарата (скорость нагрева была 0,25 град/мин). Спектры КД были сняты на дихрографе Rossel-Jouan II, оснащенный источником света мощностью 200 Вт (спектральная область для дихрографа 220—310 нм). Использовали 10 мм кварцевые кюветы, с плотно закрывающимися крышками. Измерения производились при концентрациях ДНК  $2 \cdot 10^{-2}$ — $3 \cdot 10^{-2}$  мг/мл. pH среды измеряли на pH-метре pH-673.

**Результаты и обсуждение.** О конформационных переходах, происходящих в молекулах ДНК в водных растворах карбамида, можно судить по изменению спектра КД при изменении концентрации карбамида (рис. 1). С повышением концентрации карбамида до 5 М уменьшается амплитуда положительной полосы при 280 нм. (для наглядности на рис. 1 приведены спектры КД в промежуточных концентрациях),

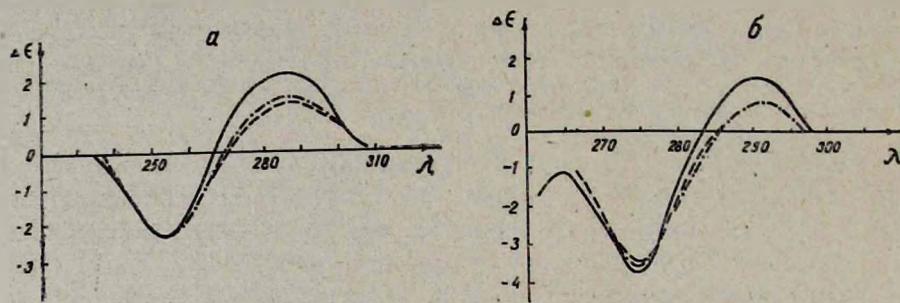


Рис. 1. Спектры КД ДНК а) тимуса телянка ( $X_{\text{ГЦ}} = 0,42$ ), б) фага Т2 ( $X_{\text{ГЦ}} = 0,34$ ), в 0,1 SSC при концентрации карбамида — 0М; --- 5М; - - - 8М.

и происходит смещение точки пересечения спектра с базисной линией в сторону длинных волн. Учитывая, что в исследуемых растворах не наблюдается агрегации или изменения третичной структуры молекулы ДНК (отношение  $A_{320}/A_{260}$  близко к нулю), т. е. исключена возможность образования в растворе  $\Psi$ -ДНК, КД спектр которой в начальной стадии перехода практически идентичен со спектром С-формы ДНК, можно заключить, что с увеличением концентрации карбамида реализуется именно С-форма, которая лучше всего проявляется при 5 М карбамида. Конформационные переходы, судя по КД спектрам, осуществляются не столь эффективно, как в водно-метанольных и солевых растворах [7, 8]. Из рис. 1 следует, что с дальнейшим увеличением концентрации карбамида (5—8 М) положительная и отрицательная полосы почти не изменяются, следовательно, не происходит закручивания двойной спирали ДНК. Это предположение подтверждается характером изменения гипохромности ДНК при увеличении концентрации карбамида в растворе.

Известно, что при переходе спираль—клубок АТ- и ГЦ-нуклеотидные пары должны вносить в гипохромность различный вклад, в зависимости от того, в какой спиральной форме они находились до перехода.

Однако до сих пор принято считать, что это различие невелико, и поэтому поглощение не чувствительно к переходам между двуспиральными

Таблица 1  
Гипохромность ДНК при разных концентрациях карбамида, 0/с

Концентрация карбамида, М	0	2	4	5	5,5	6	7	8
ДНК фага Т2	38,5	36	34,5	—	33	30	30,5	29,8
ДНК тимуса теленка	34	33,8	32	31	—	29,3	29,5	—
ДНК печени крысы	38	36	37	35	—	34	33,8	33,2

формами ДНК. Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что при конформационных переходах в молекулах ДНК гипохромность уменьшается и становится практически неизменной, когда прекращается закручивание ДНК.

Для однозначности описания конформационных переходов, которые происходят в молекуле ДНК в водных растворах карбамида, и выяснения характера влияния карбамида на АТ- и ГЦ-нуклеотидные пары, мы исследовали спектры поглощения и кривые тепловой денатурации ДНК. Как и следовало ожидать, с увеличением концентрации карбамида уменьшается термостабильность молекулы ДНК [5]. На рис. 2 приведена кривая изменения температуры плавления ДНК ти-

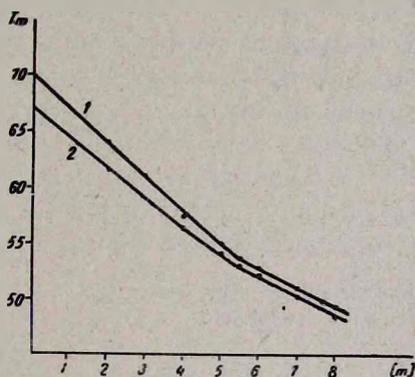


Рис. 2. Зависимость температуры плавления ДНК тимуса теленка и фага Т2 при разных концентрациях карбамида.

муса теленка и фага Т2 в зависимости от концентрации карбамида. Из графиков следует, что в области концентраций, близких к 5,5 М карбамида (где ДНК более закручена), изменяется наклон кривой  $T_m = f(M)$ , что свидетельствует о наличии качественно нового явления. Сходный характер имеет кривая изменения температуры плавления ДНК печени крысы, фага Т2 и ДНК тимуса теленка (эти ДНК различаются ГЦ-составом и характером распределения нуклеотидных пар вдоль молекулы). Изменения такого типа не наблюдались в работе Клампа [5], поскольку автор исследовал поведение ДНК до 6 М концентрации карбамида.

Интересная зависимость наблюдается для изменения интервала плавления ( $\Delta T$ ), вычисленного методом Манделя и Мармура [9], от концентрации карбамида. При добавлении карбамида (до 5 М)  $\Delta T$  несколько увеличивается, а потом остается постоянным, что указывает на различный характер действия карбамида на АТ- и ГЦ-нуклеотидные пары (табл. 2).

Таблица 2

Интервал плавления ДНК. фага Т2 и тимуса телянка при разных концентрациях карбамида в 0,1 SSC буфере

Концентрация карба-мида, М		0	2	5	5,5	6	7	8
Интервал плавления ДНК	фага Т2	3,13	3,2	3,4	3,22	3,21	3,22	3,21
	тимуса телянка	9,4	10,21	10,29	10,2	10	10,4	10,28

Было показано, что присоединение воды к ДНК в присутствии карбамида немного увеличивается [1]. Поэтому с увеличением концентрации карбамида в растворе увеличивается число молекул воды, связанных с азотистыми основаниями ДНК, что приводит к увеличению диэлектрической проницаемости (гидрофобности) среды, окружающей молекулу ДНК. Вследствие этого ДНК переходит в более закрученную конформацию (происходит В→С конформационный переход). Повидимому, с дальнейшим увеличением концентрации карбамида число молекул воды, связанных с ДНК, не изменяется, и поэтому конформационные переходы прекращаются.

Таким образом, карбамид дестабилизирует АТ- и ГЦ-нуклеотидные пары неодинаково, что указывает на различие в числе молекул, связанных с АТ- и ГЦ-парами, следовательно, степень закручивания ДНК зависит от нуклеотидного состава.

Ереванский государственный университет,  
кафедра молекулярной физики и биофизики

Поступило 3.VII 1978 г.

### ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիոն անցումները ԿԱՐԲԱՄԻԴԻ ՋՐԱՅԻՆ ԼՈՒՄՈՒՅՔՆԵՐՈՒՄ

Վ. Մ. ԱՍԿԱՆՅԱՆ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱՐԱՅԱՆ, Վ. Վ. ՍԱՂԱԹԵԼՅԱՆ, Մ. Կ. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

ԴՆԹ-ի շրային լուծույթին կարբամիդի (1-8M) ավելացումը շրջանային դիրորդմի սպեկտրում հանգեցնում է դրական գծի փոքրացման՝ ԴՆԹ-ի մոլեկուլներում խթանվում են կոնֆորմացիոն անցումները ձևերի В-ընտանիքի սահմաններում (В→С): Պրոցեսն ընթանում է առանց ԴՆԹ-ի մոլեկուլի երրորդային կառուցվածքի փոփոխության և առանց ագրեգատների առաջացման:

Ցույց է տրված, որ կարբամիդի 5M-ից մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում խախտվում է տեղի ունեցող կոնֆորմացիոն անցումների բնույթը:

# CONFORMATIONAL TRANSITIONS OF DNA IN CARBAMIDE AQUEOUS SOLUTIONS

V. M. ASLANIAN, Yu. S. BABAYAN, V. V. SAGHATELIAN,  
M. K. POGHOSIAN

The addition of carbamide into the aqueous solution of DNA leads to the decrease of positive region in circular dichroism (CD) spectrum—in DNA molecules the conformational transitions are stimulated within the bounds of B family of forms (B—C). The process proceeds without the change of tertiary structure of DNA molecule and without the aggregate formation.

It has been shown that at carbamide concentrations more than 5 M the character of running conformational transitions is disturbed.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Lewin S.* Laboratory Practice, September, 1961.
2. *Rhodos W.* J. Amer. Chem., 83, 3609, 1961.
3. *Mirsky A. F., Pauling L.* Proc. Natl. Acad. Sci. US, 22, 4699, 1936.
4. *Tanford C. J.* Amer. Chem. Soc., 86, 2050, 1964.
5. *Klump H., Burkart W.* BBA, 475, 601, 1977.
6. *Chattoraj D. K., Henry B. B.* Arch. Bioch. Biophys. 142, 363, 1971.
7. *Juanov V. I., Minchenkova L. E., Schyolkina A. K., Poletayev A. I.* Biopolymers, 12, 89, 1973.
8. *Grod J. C., Johnson W. C.* Biochem., 12, 25, 5092, 1973.
9. *Мандель М., Мармур Дж.* Методы исследования нуклеиновых кислот, 189, М., 1970.