

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ДНК В КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ СОЛЕВЫХ РАСТВОРАХ НЕСТАНДАРТНЫМ МЕТОДОМ

А. Г. ГАБРИЕЛЯН

Полуэмпирический метод, разработанный Берестецкой, Франк-Каменецким, Лазуркиным, применим для определения параметра τ ДНК в концентрированных растворах дестабилизирующей соли NaClO_4 ($1 \div 7,2 \text{ M}$). Метод позволяет находить τ по величине ширины интервала плавления лишь одного препарата ДНК, в то время как стандартный способ предполагает измерение температур плавления множества различных ДНК в данных условиях. Разница между дифференциальными стабильностями ГЦ- и АТ-пар увеличивается с увеличением концентрации соли от $\sim 30^\circ$ в растворе 1 M NaClO_4 до 56° в $7,2 \text{ M NaClO}_4$. Между величинами, получаемыми стандартным и нестандартным методами, наблюдается хорошая согласованность.

Ключевые слова: ДНК, дифференциальная стабильность ГЦ- и АТ-пар, полуэмпирический нестандартный метод.

Известно, что между температурой плавления ДНК (T_m) и ее ГЦ-содержанием существует прямая зависимость [11, 13]. В стандартных ионных условиях ($1 \times \text{SSC}$) значения T_m , экстраполированные к 100% ГЦ-пар (ГЦ-полимер) ($T_{\text{ГЦ}}$) и к 100% АТ-пар (АТ-полимер) ($T_{\text{АТ}}$), отличаются друг от друга на 41° . Величина $\tau = T_{\text{ГЦ}} - T_{\text{АТ}}$ является важным эмпирическим параметром. В частности, она, наряду с теплотой плавления, определяет форму кривой плавления ДНК. Величина τ варьирует в различных растворителях [8]. В определенных условиях она может свестись и к 0 [12], и тогда главным фактором, определяющим процесс перехода спираль—клубок, становится гетерогенность стэкинга [2]. Обычно параметр τ определяют из серии измерений T_m в данных условиях для множества ДНК с различным ГЦ-содержанием.

В работе [5] разработан более простой и удобный метод определения параметра τ , основанный на теоретической обработке величин ΔT ширины интервала плавления двух ДНК—с блочной (В) и квазислучайной (R) последовательностью оснований; получена система уравнений

$$\begin{cases} \Delta_B T \approx K_B \tau, \\ \Delta_R T \approx K_R \tau^{1,6}, \end{cases} \quad (1)$$

$$\quad (2)$$

$K_B = \sqrt{2\pi} \Sigma_x$, где Σ_x — дисперсия кривой распределения блоков по составу. Существенным допущением теории является то, что распределение блоков по составу описывается гауссовой кривой.

Уравнение (1)—приближенная форма уравнения $(\Delta_B T)^2 = 2\pi (T_{ГЦ} - T_{АТ})^2 \Sigma_x + (\Delta_R T)^2$. Для гетерогенной ДНК, каковой является ДНК тимуса теленка, $\frac{\Delta_B T}{\Delta_R T} \sim 3$, так что последнее слагаемое дает вклад не более 5%. Поэтому с хорошей точностью имеем уравнение (1). Таким образом, ширина кривой плавления ДНК пропорциональна ширине распределения блоков по составу.

Здесь K_B и K_R —множители, практически не зависящие от условий среды, при этом K_B —константа характеризующая ширину распределения блоков по составу. Уравнение (2)—интерполяционная рекуррентная формула, полученная с помощью ЭВМ.

Из уравнений следует, что измеренные в одних и тех же условиях величины $\Delta_B T$ и $\Delta_R T$ должны быть связаны между собой соотношением $\Delta_R T = A(\Delta_B T)^{1.6}$ (3), где A —константа, не зависящая от условий.

Оценка K_B и K_R проводится с учетом результатов Мармура и Дотти [11], полученных стандартным методом. Тогда одно из уравнений—(1) и (2)—позволяет определить параметр τ .

В работе [5] было найдено, что τ возрастает до 100° при уменьшении в растворе ДНК концентрации ионов Na^+ до 10^{-4} М. Однако, как выяснилось в дальнейшем [1, 6, 7], экспериментальные результаты, касающиеся столь низких ионных сил, оказались ошибочными. Слишком существенны погрешности, связанные с наличием примесных ионов многовалентных металлов. Так, связывание Mg^{2+} и Ca^{2+} из стекла посуды с ДНК приводит к скрепочному эффекту, обуславливая значительную часть расширения интервала плавления. Таким образом, вопрос о применимости теории и правомерности метода измерения ширины интервала плавления для определения параметра τ оставался открытым.

Нашей задачей была проверка применимости теории и определение τ в концентрированных растворах $NaClO_4$. Концентрированные растворы этой соли являются идеальными растворителями для исследования термодинамических свойств суперспиральных ковалентно-замкнутых циркулярных молекул ДНК. В этих растворах также происходит расширение интервала плавления [3, 9], а скрепочный эффект (доля заполненных мест посадки ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} на ДНК)—пренебрежимо мал. Кроме того, имелась возможность нахождения K_B и K_R в этих условиях, так как в растворе с 7,2 М $NaClO_4$ были известны значения τ , определенные стандартным методом [4, 9].

Материал и методика. В опытах использовались ДНК фага T_2 с молекулярным весом 20×10^6 и ДНК тимуса теленка с молекулярным весом 5×10^6 . Маточные растворы готовились путем растворения ДНК из-под этилового спирта в $0,1 \times SSC$. В отфильтрованный раствор каплями добавляли концентрированный раствор соли соответствующей концентрации, осторожно помешивая при температуре тающего льда (во избежание локального денатурирующего действия соли). Для устранения механических примесей раствор перед плавлением центрифугировали. Плавление ДНК осуществляли в герметически закрытых кварцевых кюветах, помещенных в термостатированную ячейку. Для предотвращения конденсации паров растворителя крышка так-

же термостатировалась, для чего использовался ультратермостат УТ-15. Оптическая плотность растворов ДНК при плавлении измерялась на спектрофотометре СФ-4А при $\lambda = 260$ нм. Температуру плавления (T_m) определяли по кривым плавления в точке $\theta = 1/2$, где θ — степень спиральности ДНК. Ширину интервала плавления (ΔT) находили как разность температур, при которых касательная в точке наибольшей крутизны пересекает прямые $\theta = 0$ и $\theta = 1$.

Полученные экспериментальные данные анализируются исходя из теории перехода спираль—клубок в ДНК с квазислучайной и блочной последовательностями оснований.

Результаты и обсуждение. Измерялись величины T_m и $\Delta_R T$ ДНК фага T_2 (с квазислучайной последовательностью оснований) и тимуса теленка (T_m и $\Delta_B T$) с блочной последовательностью в растворах перхлората Na ($1 \div 7,2$ М).

Логарифмирование уравнения (3) дает:

$$\lg \Delta_B T \approx A' + 1,6 \lg \Delta_B T.$$

На рис. 1 показано, что с учетом погрешности при измерениях точки $\lg \Delta_R T = f(\lg \Delta_B T)$ действительно ложатся на прямую с наклоном 1,6. Таким образом, система уравнений (1), (2) для наших условий справедлива.

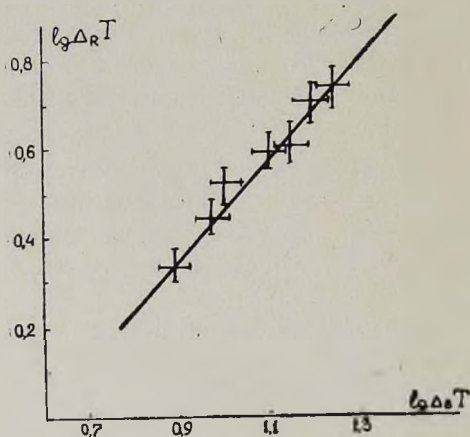


Рис. 1. Зависимость $\lg \Delta_R T$ ДНК фага T_2 от $\lg \Delta_B T$ ДНК тимуса теленка. Прямая линия — теоретическая, с наклоном 1,6.

Коэффициенты K_B и K_R определяли, пользуясь найденной стандартным методом зависимостью T_m от доли ГЦ-пар ДНК в растворе 7,2 М NaClO_4 ($\tau = 56^\circ$) [4, 9]. Отсюда, имея для $\Delta_B T = 16,8^\circ$, а для $\Delta_R T = 5,7^\circ$ в 7,2 М NaClO_4 , нашли из (1) и (2) $K_B = 0,3$; $K_R = 0,09$. Затем, подставив значения K_B и K_R в уравнения, вычислили для различных концентраций соли величины параметра ($T_{ГЦ} - T_{AT}$) $\equiv \tau$ (рис. 2). Как можно видеть из рисунка, величины τ увеличиваются при увеличении концентрации NaClO_4 от значений, меньших, чем при стандартных ионных условиях ($\sim 30^\circ$ в растворе 1 М NaClO_4), до 56° в 7,2 М NaClO_4 . Величины τ , полученные из уравнений (1), (2), совпадают в пределах ошибки определения. Следовательно, измеряя величину ширины интервала плавления лишь одного препарата ДНК, можно определить параметр τ в концентрированных растворах соли. Метод заме-

иет способ измерения значений T_m множества ДНК с различным составом оснований

Отметим, что в точках, для которых имеются данные, полученные как стандартным, так и нестандартным методами, наблюдается хорошее согласие. Следовательно, применение теории оправдано в условиях концентрированных растворов соли NaClO_4 .

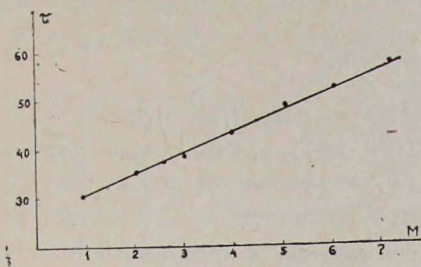


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость рассчитанных величин параметра τ от концентрации соли NaClO_4 .

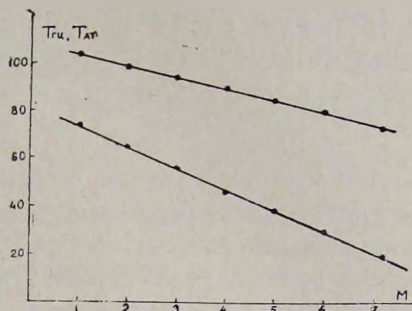


Рис. 3.

Рис. 3. Значения T_{GC} и T_{AT} как функция концентрации соли NaClO_4 .

Значения T_{GC} и T_{AT} получаются при использовании полученных значений T_m , исходя из уравнения $T_m = T_{AT} + X(T_{GC} - T_{AT})$, где X —доля ГЦ-пар (для ДНК тимуса теленка—0,42, а для ДНК фага T_2 —0,33) (рис. 3). В этих пределах концентраций соли NaClO_4 разница между стабильностями АТ- и ГЦ-пар растет с увеличением концентрации соли.

Таким образом, ионная сила раствора влияет не только на электростатические взаимодействия фосфатных групп, но и изменяет относительную стабильность АТ- и ГЦ-пар в ДНК. Это, по-видимому, определяется действием соли на воду-растворитель ДНК. Известно [10], что АТ-пары гидратированы больше ГЦ-пар. Поэтому изменение активности воды солью по-разному влияет на стабильность АТ- и ГЦ-пар.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 4.I 1980 г.

ԿՈՆՅԵՆՏՐԱՑՎԱԾ ԱՂԱՅԻՆ ԼՈՒՍՈՒՅԹՆԵՐՈՒՄ ԴՆԹ-Ի ԴԻՖԵՐԵՆՑԻԱԼ
ԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՈՉ ՍՏԱՆԴԱՐՏ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Ա. Դ. ԳԱՐԻԵԼՅԱՆ

Ցույց է տրված, որ ԴՆԹ-ի պարամետրը (U_S և $ԳՑ$ զույգերի դիֆերենցիալ կայունությունների տարբերությունը) NaClO_4 աղի կոնցենտրացիայի (1—7,2 M) լուծույթներում որոշելու համար կիրառելի է Բերեստեցկայի Ֆրանկ-Կամենեցկու և Լազուրկինի կողմից առաջարկված կիսաէմպիրիկ մե-

թույլ: Վերջինս հնարավորություն է տալիս մի շարք ԴՆԹ-ների հալման քերամաստիճանները չափելու փոխարեն (ստանդարտ եղանակ) միայն մեկ ԴՆԹ-ի նմուշի հալման տիրույթը չափելով որոշել τ -ն: τ -ի արժեքը մեծանում է 30° -ից (1 M NaClO₄ լուծույթում) մինչև 56° (7,2 M NaClO₄ լուծույթում): Ստանդարտ և ոչ ստանդարտ եղանակներով ստացված տվյալները համընկնում են:

DETERMINATION OF DIFFERENTIAL STABILITY OF DNA IN CONCENTRATED SALT SOLUTIONS BY NON-STANDARD METHOD

A. G. GABRIELIAN

For the determination of parameter τ of DNA (the difference between differential stabilities of AT—and Gc-base pairs) in high concentrated salt solutions (1—7,2 M NaClO₄) it is possible to apply the non-standard method of Berestetskaya, Frank-Kamenetskii, Lasurkin. This method allows to define τ without measuring the melting point temperatures of a number of different DNAs. The τ values increase from $\sim 30^\circ$ (in 1 M NaClO₄ solution) to 56° (in 7,2 M NaClO₄ solutions). A coincidence has been observed between data received by non-standard and standard methods.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Валеев В. А., Хоменко С. А., Гладченко Г. О. Мол. биол., 11, 748, 1977.
2. Воскобойник А. Д., Монаселидзе Д. Р., Мгеладзе Г. Н., Чанчалашвили З. И., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д. Мол. биол., 9, 785, 1975.
3. Габриелян А. Г. Биофизика, 24, 620, 1979.
4. Габриелян А. Г. Канд. дисс., Пушкино, 1974.
5. Berestetskaya I. V., Frank-Kamenetskii M. D., Lazurkin Ju. S. Biopolymers, 13, 195, 1974.
6. Berestetskaya I. V., Frank-Kamenetskii M. D., Lazurkin Ju. S., Lyudskanov Ju. L., Pavlov V. M. Biopolymers, 14, 155, 1975.
7. Boscho G. Ch., Valeev V. A., Chomenko S. A. Studia Biophys., 1, 1977.
8. Gelduschek E. P. J. Mol. Biol., 4, 467, 1962.
9. Hamaguchi K., Gelduschek E. P. J. Amer. Chem. Soc., 84, 1329, 1962.
10. Hears J. E. Biopolymers, 3, 57, 1965.
11. Marmur J., Doty P. J. Mol. Biol., 5, 109, 1962.
12. Melchior W. B., von Hippel P. H. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 70, 298, 1973.
13. Schildkraut C., Lifson S. Biopolymers, 3, 195, 1965.