ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
XLII 1966 4

БИОФИЗИКА

В. М. Асланян, А. Г. Габриелян, М. А. Новоселер и Э. Г. Товмасян

Влияние ионной силы раствора на тепловую денатурацию ДНК

(Представлено академиком АН Армянской ССР. Г. Х. Буниятяном 1/VI 1965)

Хорошо известно, что повышение температуры приводит к существенному изменению нативной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в растворе. Это изменение обусловлено разрушением водородных связей. Переход из спиральной конформации в клубкообразную известен под названием перехода спираль-клубок или денатурации ДНК.

В 1952 г. Шаком и Топсетом [1] было установлено, что интенсивность полосы поглощения ДНК с максимумом в области 260 mμ относительно мала для нативной формы и велика для денатурированной. Явление это известно под названием гипохромного эффекта.

Процесс денатурации, прослеженный по гипохромизму, осуществляется в сравнительно узком температурном интервале, чем напоминает фазовые переходы. В отличие от истинного фазового перехода, плавление ДНК должно характеризоваться двумя параметрами—температурой плавления T_m и шириной интервала перехода ΔT. Температура плавления соответствует температуре, при которой половина мономерных единиц макромолекулы не принимает участия в образовании водородных связей. Очевидно, что температура плавления должна характеризовать стабильность спирали ДНК.

Исследованию тепловой денатурации ДНК посвящено большое количество работ. Повышенный интерес к тепловой денатурации объясняется рядом причин. Во-первых, очевидно, что процесс редупликации ДНК должен идти через полную или частичную денатурацию. Во-вторых, изучение денатурации вскрывает многие важные черты внутренней молекулярной структуры нукленновых кислот и расширяет наши представления о природе сил, стабилизирующих специфическую конфигурацию ДНК. В-третьих, исследование ренатурации позволяет судить о кинетике и этапах плавления ДНК.

Мы проводили детальное исследование изменений параметров T_m и ΔT с увеличением концентрации ионов Na^+, связывая их с

определенными структурными изменениями и кооперативностью процесса. Кстати, изучению этих вопросов был посвящен ряд работ, но большая часть их была посвящена либо малым ионным силам, до 0,1 M NaCl, либо значительным, выше 1 M NaCl. Промежуточная область ионных сил изучена явно недостаточно.

Переходы спираль-клубок прослеживались по ультрафиолетовому поглощению, весьма чувствительному к числу пар азотистых оснований, связанных водородными связями, и по вязкости, чувствительной к незначительным локальным изменениям структуры молекул.

Объектом наших исследований была ДНК тимуса теленка. Проводилось изучение температурной зависимости оптической плотности водных растворов ДНК в УФ-области при разных ионных силах на $\lambda = 259$ *мк*. Измерения проводились на спектрофотометре СФ-4. Спектры поглощения были сняты для водных растворов ДНК в интервале ионных сил 0—0,4 M NaCl и для 1 M NaCl. Концентрация ДНК в растворах, уточненная спектрофотометрически, $-40 \frac{\text{мг}}{\text{мл}}$. Плавление ДНК исследовалось двумя способами.

Первый способ. Раствор нагревался до заданной температуры, и после пятнадцатиминутного отжига снимался спектр поглощения. Затем раствор быстро охлаждался переключением кюветы ко второму термостату с постоянной температурой 25°C и снова измерялась оптическая плотность. Последующее нагревание того же раствора проводилось до более высокой температуры.

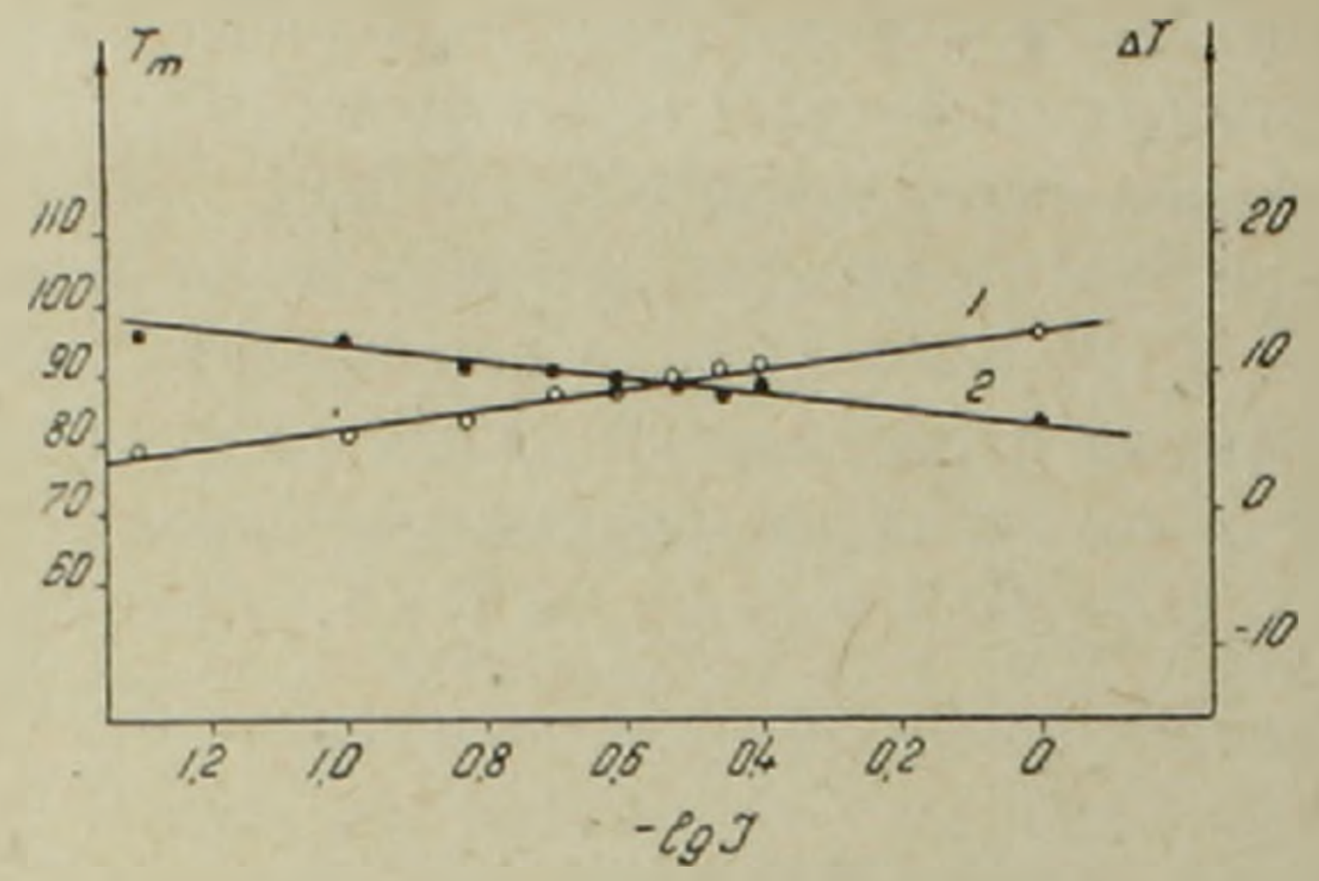
Второй способ. После нагревения до температуры 100°—105°C, раствор медленно охлаждался до 25°C и проводилось соответственно измерение оптической плотности. Охлаждение происходило вместе с термостатом до 25°C. Время охлаждения 6—7 часов.

Исследование температурной зависимости вязкости растворов ДНК проводилось на вискозиметре Оствальда с временем истечения растворителя порядка 110 *сек.* при температуре 25°C.

Параметры перехода спираль-клубок весьма чувствительны к ионной силе раствора. Известно, что при добавлении ионов щелочных металлов в водный раствор ДНК, температура плавления T_m растет с ростом ионной силы, по крайней мере до 1,0 M содержания солей ([2, 3]). Нами проводилось систематическое исследование влияния ионов Na^+ на параметры денатурации. С увеличением ионной силы раствора наблюдается значительное увеличение температуры плавления (фиг. 1). Так, для сравнения отметим, что при изменении ионной силы от 0,05 до 1 M NaCl, температура плавления изменяется более, чем на 16°C. Температура плавления определялась нами из кривой плавления как температура, соответствующая точке $\frac{1}{2}\left[\left(\frac{D_T}{D_{25}}\right)_{max} + 1\right]$, т. е. по средней точке кривой плавления. Интервал перехода ΔT определялся по касательной в точке $T = T_m$. Увеличение температуры плав-

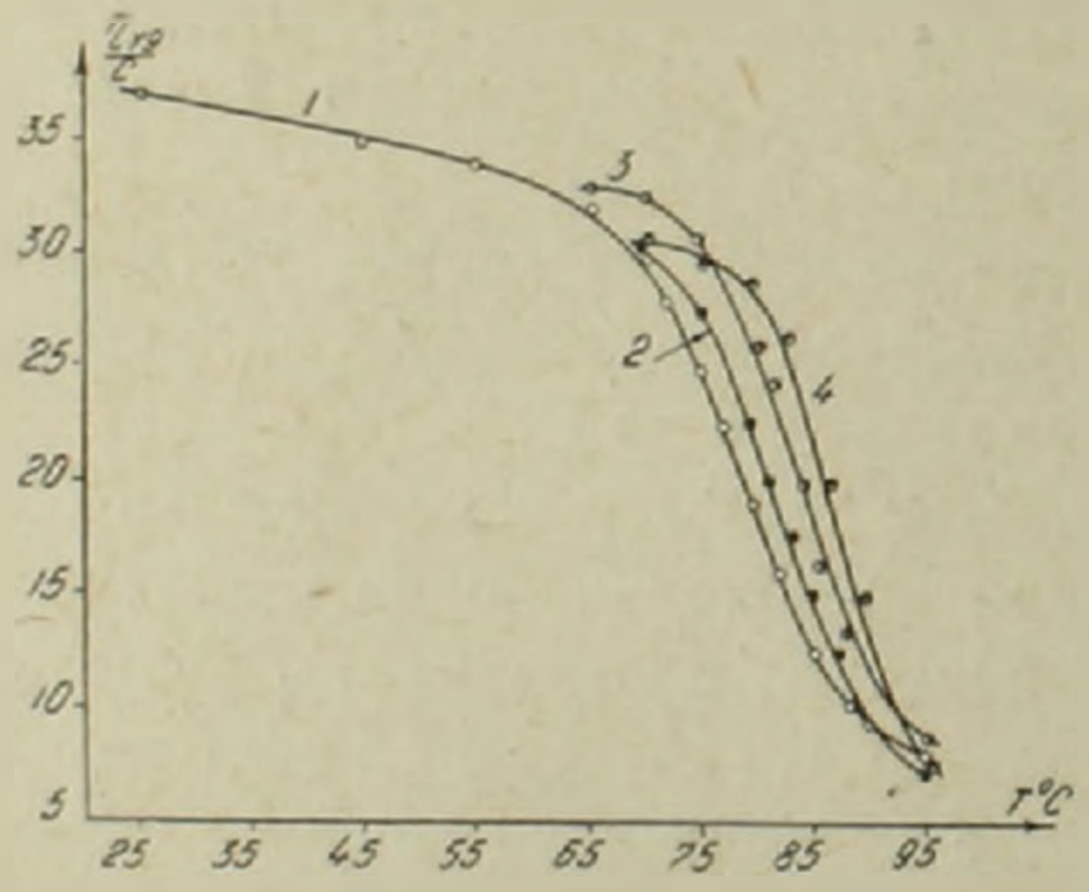
ления с повышением ионной силы может быть объяснено экранированием отрицательно заряженных фосфатных групп ионами Na^+, что приводит к понижению энергии электростатического отталкивания между цепями двухтяжевой спирали ДНК, а, следовательно, к увеличению температуры плавления.

Нами была исследована зависимость вязкости солевых растворов ДНК от температуры. Общий ход кривых, в основном, напоминает



Фиг. 1. Зависимость температуры плавления ДНК T_m (кривая *1*) и интервала плавления ΔT (кривая *2*) от логарифма ионной силы.

кривые гипохромного эффекта, с тем только отличием, что здесь в той же области температур вязкость раствора уменьшается. Температуры плавления ДНК, полученные вискозиметрически (фиг. 2) и спектрофотометрически совпадают. При этом вязкость начинает изменяться уже при относительно низких температурах. Как уже отмечалось выше, это, по-видимому, определяется тем, что вязкость чувствительна к небольшим локальным изменениям структуры, способным увеличить гибкость макромолекулы и облегчить ее сворачивание в статистический клубок. Эти изменения, возможно, возникают из-за разрыва относительно небольшого числа водородных связей, которое невозможно определить спектрофотометрически. О существовании структурных изменений такого рода свидетельствуют и независимо проведенные микрокалориметрические измерения (4).



Фиг. 2. Температурная зависимость приведенной вязкости растворов ДНК следующих ионных сил: *1*—0,05; *2*—0,10; *3*—0,15; *4*—0,2 (концентрация ДНК—$60\ \frac{\gamma}{мл}$).

Благодаря небольшим локальным структурным изменениям макромолекула ДНК приобретает дополнительные степени свободы, при этом ориентация азотистых оснований практически может и не изме-

няться. Согласно же теории Тиноко ([5]), гипохромизм определяется именно взаимной ориентацией боковых азотистых оснований, так что спектрофотометрия является лишь косвенным методом определения числа разорванных водородных связей. Следует отметить, что о небольших структурных изменениях при низких температурах свидетельствует и метод динамического двойного лучепреломления в потоке.

Как спектрофотометрическое, так и вискозиметрическое изучения денатурации ДНК свидетельствуют о повышении стабильности макромолекул с увеличением концентрации ионов Na^+. В самом деле, как видно из фиг. 1, температура плавления спиралей линейно зависит от логарифма ионной силы, что находится в полном согласии с имеющимися литературными данными ([2]) и теоретическими представлениями Уолкера ([6]). При относительно низких ионных силах зависимость температуры плавления от концентрации ионов имеет вид ([6]): $T_m = A + B \lg I$, где A и B—константы. Очевидно, что температура плавления должна расти по мере уменьшения числа свободных зарядов на молекуле ДНК. Теоретический подсчет максимального значения температуры плавления для незаряженной ДНК дает 98°С ([6]).

Вместе с исследованием влияния ионной силы на стабильность молекул (на температуру плавления), нами изучалось влияние концентрации ионов N_a^+ на интервал перехода спираль-клубок в ДНК. Из фиг. 1 видно, что интервал перехода уменьшается с ростом ионной силы. Эта зависимость аналитически может быть представлена в виде $\Delta T = -a \lg I + b$, где a и b — положительные постоянные величины. Денатурация происходит хотя и в узком, но конечном интервале температур. Последнее означает, что плавление двухтяжевой спирали ДНК не есть истинно фазовый переход. Небольшие значения ΔT свидетельствуют о том, что процесс перехода спираль-клубок кооперативен. Строго говоря, кооперативный характер плавления обусловлен значительной зависимостью изменения свободной энергии молекулы при образовании водородной связи в соседних с ней мономерных единицах. Эта кооперативность носит, по-видимому, чисто энтропийный характер. Действительно, разрыв водородных связей одной пары оснований энергетически невыгоден. Повышение энергии молекулы не может быть скомпенсировано увеличением энтропии, так как свободная от водородных связей пара оснований не получила достаточного количества степеней свободы из-за связанности соседних оснований в цепи. Для того, чтобы процесс плавления был бы термодинамически выгоден, одновременно должно разорваться большое число водородных связей, что приводит к значительному выигрышу энтропии, способному перекрыть проигрыш в энергии разорвавшихся водородных связей. Очевидно, что чем уже интервал перехода, тем больше степень кооперативности процесса. Тогда с увеличением ионной силы раствора возрастает степень кооперативности перехода спираль-клубок.

Уменьшение интервала плавления с ростом ионной силы раствора может быть объяснено следующим образом. Ионы Na^+, находящиеся у заряженных фосфатных групп, могут рассматриваться как скрепки между полипептидными цепями. В работе ([7]) приведены теоретические выражения для изменения температуры и интервала плавления:

$$\delta T_m = 2\frac{p-1}{p+1}\frac{T_0^2}{U}c, \tag{1}$$

$$\delta\Delta T = 4\left(\frac{p-1}{p+1}\right)^2\frac{T_0^2}{U}c. \tag{2}$$

δT_m и $\delta\Delta T$ есть изменения температуры и интервала плавления спирали ДНК, T_0 — температура плавления для ДНК без скрепок; $p=e^{\Delta T}$, где Δ — свободная энергия, добавляемая скрепкой к энергии связи пары нуклеотидов, а температура T выражена в энергетических единицах; U — средняя энергия связи пары нуклеотидов при отсутствии скрепок. Выражения (1) и (2) позволяют установить прямую связь между δT_m и $\delta\Delta T$:

$$\delta\Delta T = 2\frac{p-1}{p+1}\delta T_m. \tag{3}$$

Здесь можно считать, что p заведомо меньше единицы, так как теоретическая обработка результатов работы ([8]) по pH-плавлению ДНК свидетельствует о том, что при низких pH, т. е. большой концентрации ионов $[H^+]$, параметр $p \approx 0$. Отметим, что согласно ([8]) кооперативность перехода растет с увеличением концентрации H^+. Если же $p<1$, то выражение (3) приводит к отрицательным значениям $\delta\Delta T$, т. е. с повышением температуры T_m сужается интервал плавления ΔT (фиг. 1).

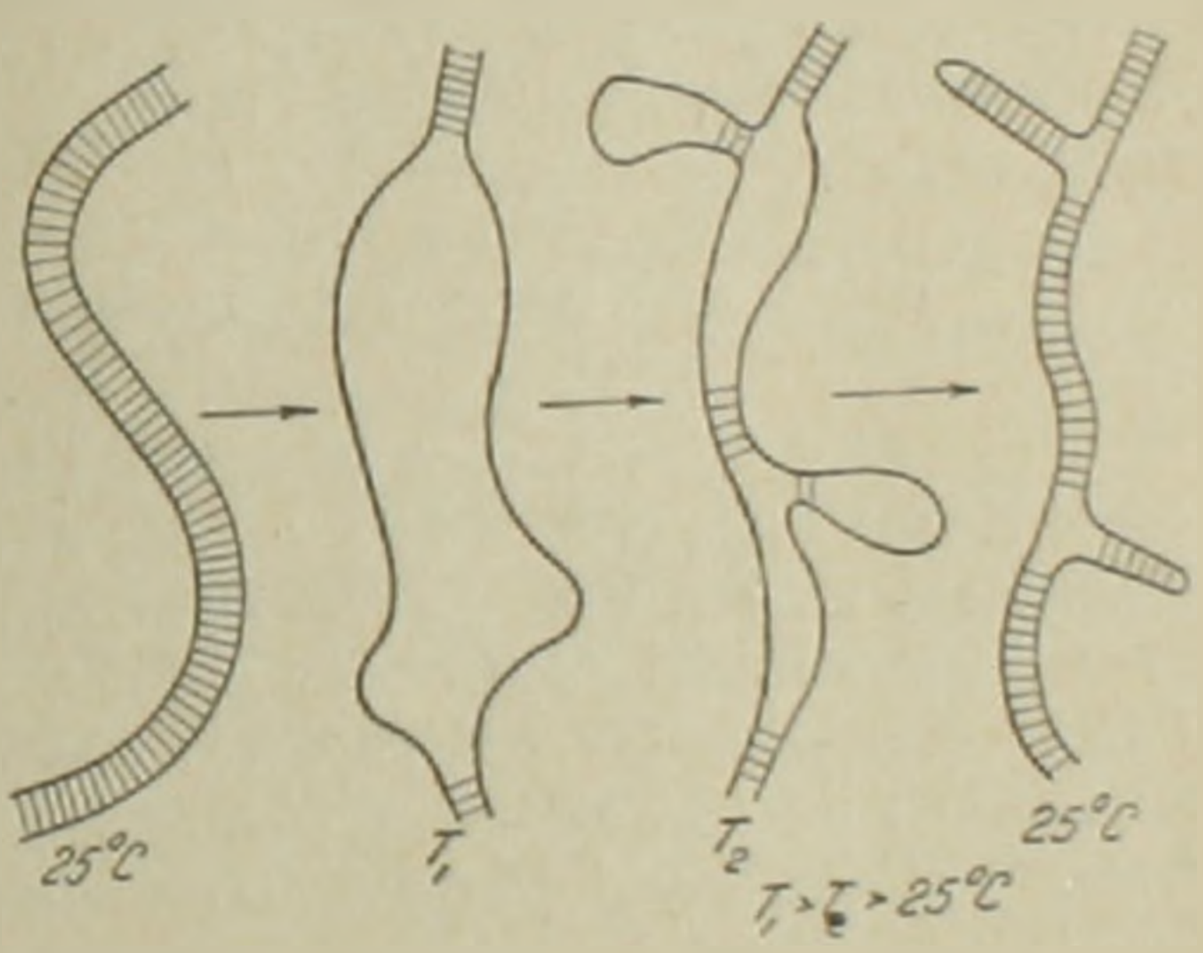
Теоретический учет взаимодействий дальнего порядка при оценке изменения свободной энергии перехода спираль-клубок, проведенный О. Б. Птицыным ([9]) также приводит к сужению интервала плавления. Очевидно, что силы дальнодействия весьма существенны для полиэлектролитов, где они носят характер кулоновского отталкивания. Поскольку в нативном состоянии макромолекулы ДНК—достаточно жесткие образования, то их флюктуационное изгибание существенно затруднено. Поэтому взаимодействием дальнего порядка для нативной структуры ДНК можно пренебречь. В основе денатурации ДНК лежит тот факт, что состояние макромолекулы, в котором нуклеотиды участвуют во внутримолекулярных водородных связях, является энергетически более выгодным, тогда как клубкообразное состояние выгоднее энтропийно из-за гибкости макромолекулы. А это значит, что свободные энергии этих состояний различным образом меняются при изменении температуры. Температуре перехода T_m соответствует равенство свободных энергий двух состояний. Термодинамическая выгодность процесса плавления молекул определяется ве-

личиной изменения свободной энергии при плавлении двойной спирали. Изменение свободной энергии есть

$$\Delta F = F_{кл} - F_{сп}, \qquad (14)$$

где $F_{кл}$ и $F_{сп}$ — свободные энергии клубкообразного и спирального состояний. В случае, когда молекула заряжена, свободная энергия клубкообразного состояния возрастает. В то же время с достаточной точностью можно считать, что свободная энергия спирали не зависит от степени ионизации. Следовательно, по мере повышения степени ионизации молекул возрастает изменение свободной энергии ΔF, а это означает, что затрудняется процесс перехода спираль-клубок. Последнее обстоятельство должно приводить к уширению интервала плавления с уменьшением ионной силы раствора.

Наконец, хотелось бы остановиться еще на одном факте. Интервал плавления, по-видимому, зависит от режима нагревания. Более резкий (на 3—4°С) кооперативный характер перехода при непрерывном режиме нагрева можно объяснить, исходя из теории влияния сил дальнодействия на денатурацию ДНК (°). При денатурации спиралей ДНК имеется температурная область, в которой полное разделение нитей молекул ДНК термодинамически невыгодно, а частичное—выгодно, т. е. денатурация проходит в два этапа. На первом этапе образуются частично денатурированные петлеобразные структуры, на втором же—происходит полное разделение цепей. При нагревании с возвратом очевидно, что когда мы находимся в температурной области, соответствующей первому этапу, то при охлаждении до 25°С в восстановленной структуре могут возникать ошибки (фиг. 3).



Фиг. 3. Схема образования ошибочных структур („шпилек") в молекулах ДНК при охлаждении.

Образовавшиеся петли обладают большей гибкостью, чем спиральная структура. Благодаря этой гибкости некоторые части в процессе флуктуационного изгибания цепей могут сближаться. Поэтому в процессе понижения температуры между случайными комплементарными основаниями могут образоваться водородные связи, что должно приводить к ошибкам в „восстановленной" структуре. Вероятность возникновения таких шпилек возрастает с увеличением размеров петель, что зависит от температуры, до которой был нагрет образец. Поскольку кооперативность процесса существенно зависит от молекулярного веса ДНК при малых М, то, очевидно, что кооперативность перехода в небольших шпильках будет отличаться от кооперативности перехода основной

цепи, что должно приводить к уширению температурного интервала плавления. Следует отметить, что образование этих шпилек не может быть определено спектрофотометрически, так как число невосстановленных водородных связей очень мало по сравнению с полным числом их. Поэтому УФ-поглощение структур 1 и 4 (фиг. 3) будет практически неотличимо.

В заключении авторы приносят свою искреннюю благодарность В. И. Воробьеву и его сотрудникам за предоставление препаратов ДНК.

Вычислительный центр
Академии наук Армянской ССР и ЕрГУ

Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Ա. Գ. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ, Մ. Ա. ՆԱՎՈՒՍԵԼՈՐ և Է. Գ. ԲՈՎՐԱՅԱՆ

Լուծույթի իոնական ուժի ազդեցությունը Դ'ՆԹ-ի ջերմային դենատուրացիայի վրա

Ուսումնասիրված է Na^+ իոնների ազդեցությունը ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի և հալման ինտերվալի վրա: Ցույց է տրված, որ հալման ջերմաստիճանը աճում է գծայնորեն իոնական ուժի լոգարիթմի աճման հետ, այսինքն ԴՆԹ-ի կայունությունը աճում է Na^+ իոնների կոնցենտրացիային զուգրնթաց: Միևնույն ժամանակ հալման ինտերվալը փոքրանում է: Վերջինս նշանակում է, որ իոնական ուժի աճման հետ աճում է նաև պարույր-կծիկ անցման կոպերատիվության աստիճանը: Հալման կոպերատիվությունը կախված է նաև տաքացման ուժգնից: Հաստատված է, որ մածուցիկությունը բավականաչափ զգայուն է ԴՆԹ-ի ստրուկտուրայի աննշան փոփոխությունների նկատմամբ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *H. Шак, Дж. Томпсетт*, J. Biol. Chem., 197, 17 (1952). [2] *У. Ф. Лов, Г. Девисон*, J. Mol. Biol., 5, 467 (1962). [3] *Н. Н. Аксенова, В. И. Воробьев, В. П. Кушнер*, „Биохимия", 29, 161, 1964. [4] *П. Л. Привалов, К. А. Кафиани, Д. Р. Монаселидзе*, ДАН СССР, 156, 951 (1964). [5] *Н. Тиноко*, J. Am. Chem. Soc., 82, 4785 (1960). [6] *Н. О. Уолкер*, Biochim. Biophys. Acta, 88, 407 (1964). [7] *М. Д. Франк-Каменецкий*, ДАН СССР, 157, 187, 1964. [8] *Б. Н. Сухоруков, Ю. Ш. Мошковский, Т. М. Биршейн, В. Н. Лысцов*, „Биофизика", 8, 294, 1963. [9] *О. Б. Птицын*, „Биофизика", 7, 257, 1962.