

М. А. СЕМЕНОВ, А. И. ГАСАН, В. Я. МАЛЕЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ТЕРМИЧЕСКОГО РАЗРУШЕНИЯ ФАГА T_2 И ЕГО КОМПОНЕНТОВ МЕТОДАМИ И.-К СПЕКТРОСКОПИИ И АДИАБАТИЧЕСКОЙ КАЛОРИМЕТРИИ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 20 VIII 1970)

Распад белковонуклеинового комплекса вирусов на составные структурные компоненты может происходить при различных внешних воздействиях. При нагревании ДНК-содержащего фага T_2 до $60-70^\circ$ обнаруживаются видимые в электронный микроскоп морфологические изменения, связанные с опустошением головок фага. Дальнейшее нагревание до $80-90^\circ$ приводит к полному распаду фаговых компонентов (1). Было найдено, что эти структурные разрушения приводят к изменению некоторых физических характеристик. Так, при $63-65^\circ$ наблюдается резкое увеличение вязкости фаговой суспензии, связанное с изменением структуры белковых оболочек и выходом ДНК в среду. Были также обнаружены изменения оптической плотности фаговой суспензии при $\lambda = 260$ мк в температурном интервале $50-90^\circ$ (2).

Из-за перекрытия полос поглощения белка ($\lambda_m = 280$ мк) и ДНК ($\lambda_m = 260$ мк) и сильного светорассеяния в фаговой суспензии трудно проследить по ультрафиолетовым спектрам все стадии термического разрушения фага. Для этой цели более удобной оказалась малочувствительная к светорассеянию спектральная область в «окне прозрачности» тяжелой воды ($1550-1750$ см $^{-1}$), где лежат характеристические частоты связей C=O, C=N, NH $_2$, имеющиеся в белках и нуклеиновых кислотах. Характерные спектральные изменения в этой области, наблюдающиеся при нагревании растворов ДНК и белков, происходят в разных температурных интервалах и тем самым позволяют разделять следить за структурными изменениями этих веществ (3, 4).

В работе были использованы предварительно лиофилизованные фаг T_2 и его структурные компоненты — белковые «тени» и ДНК, полученные по

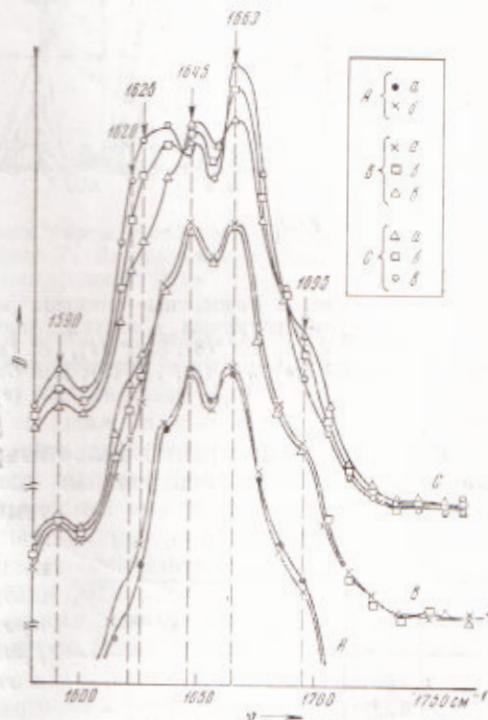


Рис. 1. И.-к. спектры суспензии фага T_2 в D_2O в трех температурных интервалах. Значения температур для A: 25° (а), 58° (б); для B: 58° (а), $68,5^\circ$ (б), 74° (в); для C: 74° (а), 83° (б), 90° (в)

методикам (5, 6). Суспензии фага и «теней» (весовая концентрация 3 и 5%) и 2% раствор ДНК были приготовлены в тяжелой воде с 0,15 М КСI, $\rho D = 5,5$. Спектры записывались с помощью двулучевого спектрофотометра UR-10 с использованием специально изготовленных термостатированных кювет (3).

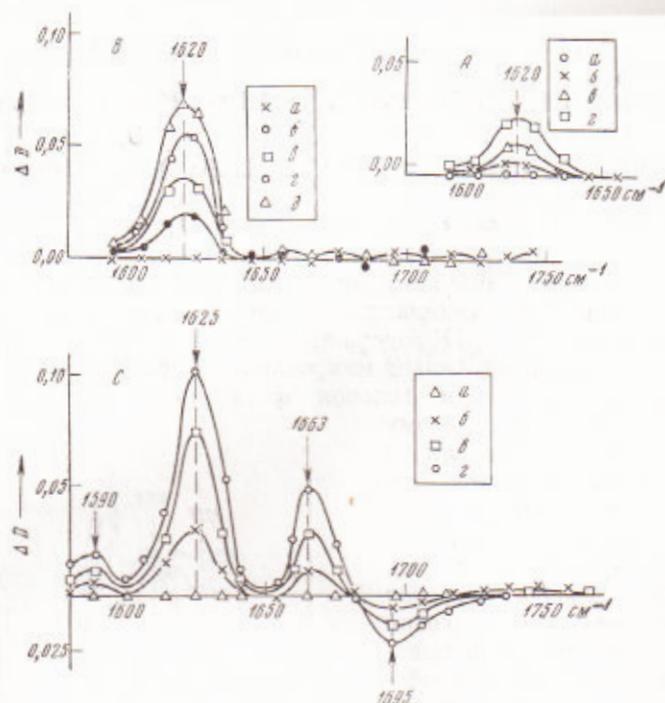


Рис. 2. Разностные спектры фаговой суспензии для трех температурных областей. Значения температур для A: 25° (a), 52° (б), 53,5° (в), 58° (г); для B: 58° (a), 65,5° (б), 69° (в), 71° (г), 74° (д); для C: 74° (a), 79,5° (б), 83° (в), 90° (г)

В результате измерений было обнаружено (рис. 1), что при нагревании фаговой суспензии спектральные изменения происходят в 3 различных температурных интервалах. При достижении температуры 48° наблюдается незначительное увеличение оптической плотности в области 1620 см⁻¹, которое прекращается при T = 58° (область A). Дальнейший рост оптической плотности в этой спектральной области начинается при T = 65° и заканчивается при T = 73° (область B).

Аналогичные спектральные изменения в указанных температурных интервалах наблюдались при нагревании суспензии «теней». Поскольку увеличение оптической плотности при 1620 см⁻¹ наблюдается при тепловой денатурации белков (4), естественно предположить, что спектральные изменения в областях A, B в случае фага T₂ вызваны конформационными изменениями в белковом чехле. При дальнейшем повышении температуры (интервал 75–85°, область C) происходят спектральные изменения, характерные для разрушения вторичной структуры ДНК (3) — увеличение поглощения на частотах 1590, 1625 и 1663 см⁻¹ с одновременным уменьшением поглощения в области 1695 см⁻¹.

Таблица 1

	T _{пл}	ΔT	ΔH, кал/г
A	55°	7°	0,5 ± 0,1
B	68°	10°	3,0 ± 0,2
C	79°	8°	3,2 ± 0,2
ДНК	84°	4°	13,2(8)

Изменения инфракрасных спектров при нагревании суспензии фага особенно наглядно видны на разностных спектрах, построенных для каждого температурного интервала и характерных для белков и ДНК (рис. 2). Температурные разрезы этих спектров (при 1620 см^{-1} для интервалов *A*, *B* и при 1625 см^{-1} для интервала *C*) дают кривые плавления соответственно белков и ДНК (рис. 3), позволяющие определить такие параметры теплового перехода, как температура и интервал плавления (табл. 1).

Энергетические характеристики этих переходов были получены путем измерения теплопоглощения фаговой суспензии в таких же условиях методом абсолютной адиабатической калориметрии. Результаты этих измере-

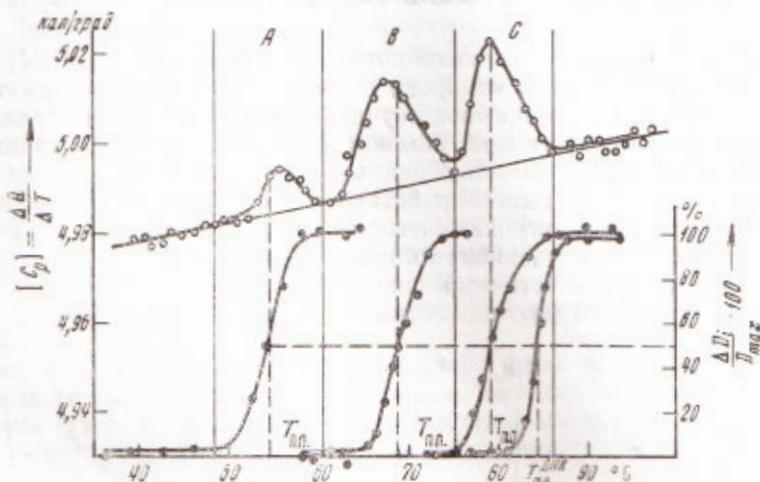


Рис. 3. Температурные зависимости парциальной теплоемкости и кривые плавления для суспензии фага T_2 . Для сравнения приведена кривая плавления фаговой ДНК

ний представлены на рис. 3 в виде кривой зависимости парциальной теплоемкости (C_p) от температуры. Три области поглощения энергии, имеющиеся на этой кривой, совпадают с интервалами *A*, *B*, *C*, обнаруженными по данным и-к. спектроскопии. Учитывая, что в фаге T_2 соотношение ДНК/белок равно 1, можно рассчитать изменение энтальпии ΔH (на суммарный белок и ДНК). Заметим, что для разрушения ДНК в суспензии фага требуется примерно в 4 раза меньше энергии, чем для разрушения фаговой ДНК в растворе. Эти данные указывают на возможное ослабление внутримолекулярных связей в ДНК, находящейся в фаговой суспензии за счет взаимодействия ее с окружающим фаговым белком (ср. ⁽²⁾). Различия в температурах и интервалах плавления для ДНК в фаговой суспензии и в растворе, полученные из и-к. спектров (табл. 1), свидетельствуют в пользу такого предположения.

Таким образом, по данным и-к. спектроскопии и адиабатической калориметрии можно выделить 3 этапа в термическом разрушении фага T_2 : две стадии разрушения белковой оболочки и стадию плавления вторичной структуры ДНК.

Институт радиофизики и электроники
Академии наук УССР
Харьков

Поступило
27 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. С. Тихоненко, Ультраструктура вирусов бактерий, «Наука», 1968.
- ² Т. И. Тихоненко, Е. Н. Добров и др., Биофизика, 3, 386 (1966).
- ³ В. Я. Малеев, М. А. Семенов, Докл. АН УССР, 1, 73 (1970).
- ⁴ М. А. Семенов, Г. Н. Костоглодова, В. Я. Малеев, Докл. АН УССР, № 9 (1970).
- ⁵ Т. И. Тихоненко, Биохимия, 27, 1015 (1962).
- ⁶ R. M. Herriot, J. L. Varlow, J. Gen. Physiol., 36, 17 (1952).
- ⁷ П. Л. Привалов, Молекулярная биология, 5, 690 (1969).