

В. Д. ПАПОНОВ, Д. М. СПИТКОВСКИЙ, В. В. БОГДАНОВ,  
П. С. ГРОМОВ

### СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДА

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 29 IV 1972)

В настоящее время одной из важнейших биологических проблем является выяснение принципов организации и механизмов структурных модификаций хроматина в процессе жизнедеятельности клеток. Весьма полезным в этом плане могло бы оказаться изучение в растворах явлений упорядочивания макромолекул дезоксирибонуклеопротеида (ДНП) — основного структурного компонента хромосом. Для этой цели мы исследовали реологическое поведение нуклеопротейных растворов с помощью низкоградиентного ротационного вискозиметра.

В основу конструкции вискозиметра положен принцип немеханического привода, на один из вариантов которого впервые указали Цимм и Крозерс (1). Рабочая ячейка прибора изображена на рис. 1. Ротор (5) вискозиметра — пробирка с магнитным материалом (8) — находится во взвешенном состоянии в исследуемой жидкости, налитой в термостатируемый статор (4). Ротор подбирается по весу с помощью наполнителя (7) таким образом, чтобы мениск жидкости был несколько выше, чем торец ротора (на 1—3 мм), и торец был смочен. Силы поверхностного натяжения напряженного мениска исследуемой жидкости обеспечивают коаксиальное положение ротора в статоре. Рабочая ячейка вискозиметра помещается в цилиндрическую полость статора однофазного электродвигателя переменного тока (2). Механический момент на роторе создается в результате взаимодействия магнитного материала, помещенного в ротор, с вращающимся переменным магнитным полем в статоре электродвигателя. Измерения вязкости осуществляются при постоянном напряжении сдвига, определяемом размерами измерительных поверхностей вискозиметра, величиной магнитного материала в роторе и электрическим напряжением на статорных обмотках электродвигателя. Последнее позволяет измерять вязкость в довольно широком интервале напряжений сдвига ( $5 \cdot 10^{-5} \div 2 \cdot 10^{-1}$  дн/см<sup>2</sup>) используя один ротор, что невозможно в случае вискозиметра Цимма и Крозерса. Относительная вязкость растворов выражается через отношение периодов вращения ротора в растворе и растворителе:  $\eta_{\text{отн}} = T_{\text{р-р}} / T_{\text{р-ль}}$ . Точность измерения относительной вязкости  $\pm 0,5\%$ .

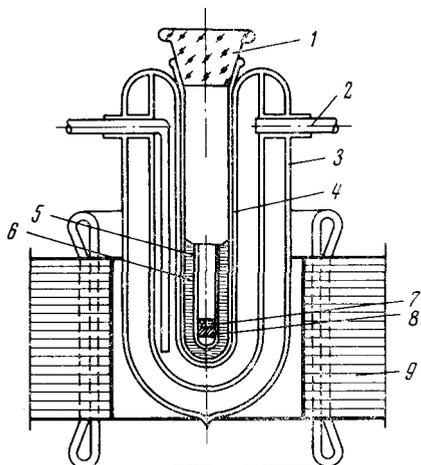


Рис. 1. Схема ротационного вискозиметра. 1 — пробка, 2 — циркулирующая термостатная жидкость, 3 — вакуумная рубашка, 4 — статор, 5 — ротор, 6 — исследуемая жидкость, 7 — наполнитель (эпоксидная смола), 8 — магнитный материал (железо «Армо»), 9 — статор электродвигателя

Рис. 1. Схема ротационного вискозиметра. 1 — пробка, 2 — циркулирующая термостатная жидкость, 3 — вакуумная рубашка, 4 — статор, 5 — ротор, 6 — исследуемая жидкость, 7 — наполнитель (эпоксидная смола), 8 — магнитный материал (железо «Армо»), 9 — статор электродвигателя

Препараты ДНП получали из тимуса теленка и печени крыс по методу Мирского и Поллистера<sup>(2)</sup>, модифицированному в нашей лаборатории. 20 г измельченной свежемороженой ткани гомогенизируются в 300 мл стандартного раствора (0,14 М NaCl + 0,014 М цитрата натрия, рН 7,0) с помощью размельчителя тканей (объем стакана 1 л) в течение 30 сек. при 8000 об/мин. Гомогенат центрифугируется 20 мин. при 3000 g. Операции повторяются 5—6 раз. Экстракция ДНП проводится в течение суток в 0,7 М NaCl + 0,014 М цитрата натрия, рН 7,0, при непрерывном перемешивании. Экстракты очищаются путем четырехкратного переосаждения в стандартном растворе (последнее переосаждение без цитрата натрия). Перед использованием препараты ДНП осветляются при 18000 g в течение часа. Все операции осуществляются при температуре не выше +4°. Препараты ДНП характеризовались по концентрации в них ДНК<sup>(3)</sup> и по содержанию белка<sup>(4)</sup>.

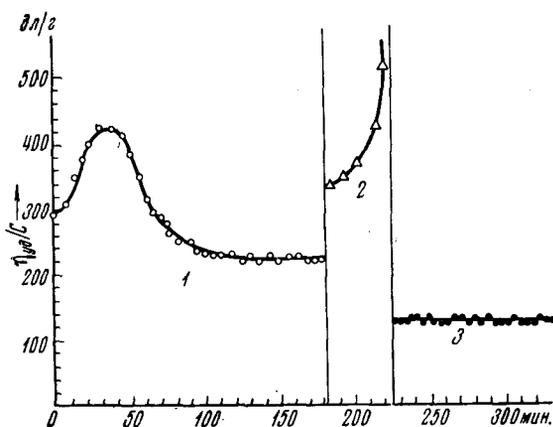


Рис. 2. Зависимость  $\eta_{уд}/C$  от времени при разных напряжениях сдвига  $\tau$ . 1 —  $\tau = 5,9 \cdot 10^{-4}$  дин/см<sup>2</sup>, 2 —  $1,9 \cdot 10^{-4}$ , 3 —  $2,6 \cdot 10^{-3}$  дин/см<sup>2</sup>.  $C_{ДНК} = 10$  мкг/мл; Белок/ДНК = 1,66;  $D_{260}^{98^\circ} / D_{260}^{25^\circ} = 1,32$

В процессе исследования реологического поведения препаратов ДНП, выделяемых по описанной выше методике, мы отметили наличие у данных систем предела текучести, что указывает на существование в них пространственной структуры. Предел текучести обнаруживается даже при концентрации ДНП порядка 10 мкг/мл. В качестве возможной артефактности мы смогли выдвинуть единственное предположение, что нуклеопротеид, будучи поверхностноактивным веществом, способен создавать жесткую поверхность пленку, приводящую к остановке ротора вискозиметра и прекращению течения раствора. Однако, если на поверхность ДНК-раствора, который только что поместили в зазор между статором и ротором вискозиметра, быстро, но осторожно наслить растворитель, так что ротор, всливая, окажется погруженным в раствор ДНП лишь своей нижней половиной, то и в этом случае можно зафиксировать отсутствие течения при некотором напряжении сдвига. Последнее говорит в пользу пространственной структуры в объеме раствора, но не поверхностных эффектов.

Помимо предела текучести, у ДНП-растворов нам удалось установить неравновесный характер этих систем, сказавшийся во временной зависимости их вязкости (см. рис. 2). Кривые, изображенные на рис. 2, можно объяснить, опираясь на развитые Г. Фрейндлихом представления о явлении тиксотропии<sup>(5)</sup>, под которой понимается способность материалов к обратимому восстановлению пространственной структуры после механического разрушения. Действительно, рост вязкости во времени (кривая 2) отражает не что иное, как восстановление разрушенных ранее межмолекулярных связей дезоксирибонуклеопротеида. В конечном счете течение прекращается и ротор останавливается, поскольку напряжение сдвига в этом случае, по-видимому, меньше, чем предел прочности пространственной структуры исследуемой системы. Кривые 1 и 3, очевидно, имеют место, когда напряжение сдвига достаточно для разрушения пространственной структуры. Иногда подразделяют тиксотропию на «прочностную» и

«вязкостную», понимая под вязкостной тиксотропией разрушение обрывков пространственной сетки в процессе течения (<sup>6</sup>). Возможно, наличие максимума на кривой течения *I* отражает некоторую особенность проявления вязкостной тиксотропии в данной системе. Экстремальный характер кривых течения вообще не редкость у тиксотропных систем. Однако удовлетворительного объяснения в современной реологии это явление пока не получило (<sup>7</sup>).

Изложенные нами данные позволяют сделать вывод, что ДНП-растворы можно отнести, следуя терминологии П. А. Ребиндера (<sup>8</sup>), к условно-твердым, тиксотропным системам.

Вплоть до настоящего времени имеют место попытки приписать тиксотропные свойства и растворам ДНК только на том основании, что их вязкость зависит от напряжения сдвига (<sup>9</sup>). Подобное заблуждение состоит в непонимании различий между «структурной вязкостью» и тиксотропией. Действительно, термин структурная вязкость был введен В. Оствальдом для описания обратимого падения вязкости при росте напряжения сдвига, а тиксотропия характеризуется аналогичным процессом. Однако, как указывал М. Рейнер (<sup>10</sup>), принципиальное отличие этих феноменов состоит в том, что восстановление структурной вязкости материалов происходит практически мгновенно после снятия напряжения, а в случае тиксотропии восстановление вязкости требует некоторого времени, иногда довольно значительного. В отличие от нуклеопротеида, реологическое поведение растворов ДНК неоднократно довольно обстоятельно исследовалось (<sup>11</sup>, <sup>12</sup>), однако о временной зависимости их вязкости нигде не упоминалось. Проведенные нами эксперименты показали, что при напряжениях сдвига меньших, чем предел прочности структуры, имеющей место в 0,001% растворе ДНП, течение растворов ДНК не прекращалось и не обнаруживало временной зависимости вязкости даже при концентрациях в 20—30 раз больших. Факт отсутствия временной зависимости вязкости растворов ДНК с концентрацией 200—300 мкг/мл установлен при градиентах скорости течения вплоть до  $5 \cdot 10^{-3}$  сек<sup>-1</sup>. Отсюда можно сделать вывод, что тиксотропность нуклеопротеида является качеством, принципиально отличающим его от ДНК в отношении их структурообразующих свойств.

Институт медицинской генетики  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
26 IV 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Н. Zimm, D. M. Crothers, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 48, 905 (1962).  
<sup>2</sup> А. Е. Mirsky, A. W. Pollister, J. Gen. Physiol., 30, 117 (1946). <sup>3</sup> А. С. Спирин, Биохимия, 23, 656 (1958). <sup>4</sup> О. Н. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). <sup>5</sup> Г. Фрейдлих, Тиксотропия, 1939. <sup>6</sup> А. А. Трапезников, Т. Г. Шалопалина, Колл. журн., 19, 232 (1957). <sup>7</sup> А. Лодж, Эластичные жидкости, «Наука», 1969. <sup>8</sup> П. А. Ребиндер, Л. В. Иванова-Чумакова, В сборн. Успехи химии и технологии полимеров, М., 1957. <sup>9</sup> D. S. Thompson, J. В. Haas, S. J. Gill, Biopolymers, 7, 571 (1969). <sup>10</sup> М. Рейнер, Реология, «Наука», 1965. <sup>11</sup> Н. Eisenberg, J. Polymer Sci., 25, 257 (1957).  
<sup>12</sup> P. D. Ross, R. L. Scruggs, Biopolymers, 6, 1005 (1968).