

УДК 547.963.3

БИОФИЗИКА

В. Ф. САВИН, М. А. МОКУЛЬСКИЙ

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА-ДНК ТИМУСА
ТЕЛЕНКА ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

(Представлено академиком А. П. Александровым 16 IV 1973)

Вторичная структура двунитчатых полинуклеотидных молекул полностью определена более чем в десяти различных случаях (природные ДНК и РНК, гибриды, синтетические полимеры разных типов ⁽¹⁾, глюкозилированная ДНК ⁽²⁾). Этими работами выяснена способность двунитчатых полинуклеотидных молекул принимать различные упорядоченные конформации. Определены не только внешние черты молекул (кратность винтовой оси, высота витка) или их упаковка, но и координаты всех атомов углеродно-фосфатной цепи и положение азотистых оснований. Эти результаты получены при изучении твердых или гелеобразных образцов в условиях различной влажности атмосферы и при температурах 20–25°. Во многих работах изучено также влияние катионов (их вида и количества) на структуру полинуклеотидов. За последнее время получены ценные данные о структуре этих веществ в растворах, именно в опытах на растворах ДНК были получены некоторые сведения о влиянии температуры на вторичную структуру полинуклеотидов ⁽³⁾ (в той области температурных, солевых и других условий, в которых сохраняется их двунитчатое строение). Однако до настоящего времени не было опубликовано данных о прямом определении методом дифракции рентгеновских лучей влияния температуры на вторичную структуру нуклеиновых кислот. Настоящая работа предпринята с целью заполнения этого очевидного пробела.

Изучались образцы Na-ДНК тимуса теленка, вытянутые из концентрированного геля. ДНК получали как фенольным методом (2 партии), так и безфенольным (2 партии), представляющим собой модификацию метода, описываемого в работе ⁽⁴⁾. Содержание белка в образцах, полученных фенольным методом, не превышало 1% и достигало 3% для образцов, полученных безфенольным методом. По нашему мнению, такие количества белка не влияют на характер дифракционной картины. Молекулярный вес ДНК составлял 6–7·10⁶ дальтонов.

Для получения рентгеновских дифракционных картин от образцов ДНК, находящихся в условиях заданной температуры и относительной влажности атмосферы, в конструкцию обычной камеры ⁽⁵⁾ были внесены некоторые изменения. Камера снабжена нагревателем, регулирующим и измеряющим термометрами, термоизоляционными стенками. Рентгеновская пленка вынесена из нагреваемого объема. Температура внутри камеры с помощью терmostатирующего устройства поддерживается в интервале от комнатной до 90° с точностью порядка 0,3–0,7°. Относительная влажность атмосферы в камере устанавливается с помощью насыщенных растворов различных солей, а также растворами LiCl различной концентрации ^(6, 7). Таким образом можно поддерживать в камере практически любую относительную влажность атмосферы от 5 до 98% при любой температуре от комнатной до 90°.

Перед рентгеновской съемкой образец ДНК выдерживался при заданных температуре и относительной влажности, как правило, около 15 час. За это время в образце успевала установиться практически равновесная

структурой. Всего было исследовано 25 образцов ДНК тимуса теленка, получено около 150 рентгенограмм. Результаты можно суммировать следующим образом.

1. Наблюдавшиеся ранее в этой ДНК при комнатной температуре А- и В-формы сохраняются и при повышении температуры до 65–85° (верхняя граница существования А- и В-форм варьировала от образца к образцу и зависела от относительной влажности). Параметры молекул и кристаллических решеток определялись по рентгенограммам с точностью около 2% для А-формы и 2–3% для В-формы, и с этой точностью они не зависят от температуры.

Рентгенограммы А-типа удавалось индицировать, предположив, что молекулы ДНК упакованы по две в моноклинную элементарную ячейку с координатами молекул в ячейке $(0, 0, 0)$, $(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)$. Средние значения параметров решетки и молекул в интервале температур от 20 до 65° и значений относительной влажности от 50 до 85% следующие:

a , Å	b , Å	c , Å	β , град.	N , отн. ед.
22.2 ± 0.4	40.6 ± 0.8	28.1 ± 0.9	97 ± 1.2	11.0 ± 0.6

(В двух образцах ДНК сохраняла структуру А-формы до температур 75–85°).

Рентгенограммы В-типа индицировались исходя из того, что молекулы ДНК упакованы по три в гексагональную элементарную ячейку с координатами молекул в ячейке $(0, 0, 0)$, $(\frac{1}{3}, \frac{2}{3}, \frac{1}{6})$, $(\frac{2}{3}, \frac{1}{3}, -\frac{1}{6})$. Параметр a гексагональной решетки В-формы зависит от температуры и относительной влажности. Средние значения параметров решетки и молекул в интервале температур от 20 до 75° и значений относительной влажности от 99 до 98% следующие:

a , Å	c , Å	p , Å	N , отн. ед.
$49 \pm 0.8 \div 40 \pm 1$	33.6 ± 0.9	3.33 ± 0.06	10.1 ± 0.4

2. При температурах 65–85° в образцах ДНК происходят существенные изменения, в результате которых, видимо, разрушается регулярная спиральная структура молекул, существенно изменяется их упаковка, а также исчезает ориентация кристаллитов.

3. Переход из В- в А-форму происходит при одном и том же значении относительной влажности, не зависящем от температуры. Ширина (по влажности) зоны существования смеси А- и В-форм составляет около 5%.

На рис. 1 изображена диаграмма состояний Na-DNK тимуса теленка в координатах h, t (относительная влажность в процентах, температура в градусах Цельсия). Области значений параметров h и t , соответствующих А- и В-формам ДНК, покрыты косой штриховкой. Пограничная область (A+B) покрыта двойной штриховкой. При значениях параметров h и t , лежащих в этой области, образцы ДНК давали дифракционную картину, представляющую собой суперпозицию картин А- и В-типа. Рядом опытов было показано, что в этих условиях в образце одновременно существуют кристаллы А- и В-форм. Справа от штриховой линии (проведенной условно) находится область значений h, t , при которых образцы ДНК дают колцевые и диффузные рентгенограммы, интерпретация которых пока невозможна. Можно только сказать, что структура и упаковка молекул в этих условиях существенно отличаются от таковых для известных регулярных двунитчатых структур А, В и т. п. Эти структуры ДНК мы будем условно называть «денатурированными», хотя утверждать, что они являются одннитчатыми или в какой-то мере сходны со структурами, возникающими при правлении ДНК в растворе, мы не можем. Следующие черты отличают

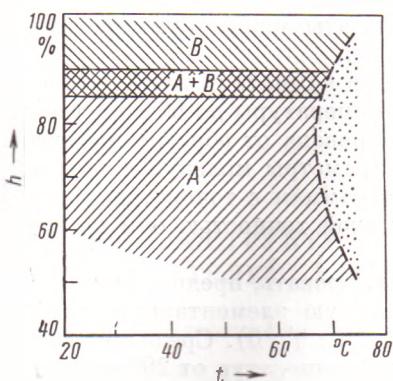


Рис. 1. Диаграмма состояний Na-ДНК тимуса теленка в координатах t и h

выдерживание образца в атмосфере высокой влажности при температурах, меньших температуры «денатурации» (но близких к ней).

Процессу денатурации Na-ДНК тимуса теленка в твердом состоянии по времени предшествует разориентация кристаллитов. Она происходит в области температур, близких к температурам денатурации этой ДНК в растворах при умеренных ионных силах и нейтральном рН.

Выражаем глубокую признательность Г. С. Столяровой за предоставление препаратов ДНК, Т. Д. Мокульской и И. Я. Скуратовскому — за полезное обсуждение работы, а также Н. Ф. Артиюхину и Т. Ю. Кепановой — за техническую помощь.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
16 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Agnott, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1970, p. 21. ² M. A. Мокульский, К. А. Капитонова, Т. Д. Мокульская, Мол. биол., 6, 883 (1972). ³ R. B. Gennis, C. R. Cantor, J. Mol. Biol., 65, 381 (1972). ⁴ J. M. Gulland, D. O. Jordan, G. J. Threlfall, J. Chem. Soc. B, 1947, 1129. ⁵ R. Langridge et al., J. Mol. Biol., 2, 19 (1960). ⁶ J. F. Young, J. Appl. Chem., 17, 241 (1967). ⁷ A. Schneider, Zs. Holz als Roh- und Werkstoff, 18, 269 (1960).