

В. Ф. САВИН, М. А. МОКУЛЬСКИЙ

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ Na-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 $6-7 \cdot 10^6$ 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 термостатирующего 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

структура. Всего было исследовано 25 образцов Na-ДНК тимуса телят, 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 температур.

Рентгенограммы А-типа удавалось индифферировать, 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 индифферировались 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	ρ , Å	N, отн. ед.
49±0,8÷40±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-ДНК тимуса телят 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 (А+В) 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 кольцевые 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 однонитчатыми или в какой-то мере сходны со структурами, возникающими при правлении ДНК в растворе, мы не можем. Следующие черты отличают

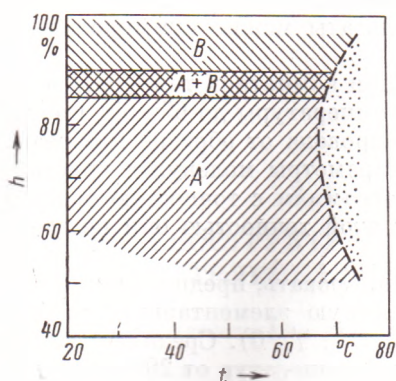


Рис. 1. Диаграмма состояний Na-ДНК тимуса телят в координатах t и h

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

Процессу денатурации Na-ДНК тимуса телят 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 pH.

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. Артюхину и Т. Ю. Кебановой — за техническую помощь.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
16 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Arnott, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1970, p. 21. ² М. А. 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, 49 (1960).
- ⁶ J. F. Young, J. Appl. Chem., 17, 241 (1967).
- ⁷ A. Schneider, Zs. Holz als Roh- und Werkstoff, 18, 269 (1960).