

УДК 577.3+548.0:53:547.963.3:542.65

БИОФИЗИКА

В. Д. ОСИКА, Т. Л. ПЯТИГОРСКАЯ, А. Т. ДЕМБО,
О. Ф. ПОЛИВЦЕВ, Б. Я. СУХАРЕВСКИЙ, В. Н. ВАСИЛЬЧЕНКО,
академик АН УССР Б. И. ВЕРКИН

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ВОДНО-СОЛЕВЫХ РАСТВОРОВ

Как известно (¹), молекулы ДНК в фагах и в хромосомах имеют форму более компактную, чем молекулы ДНК, находящиеся в растворе. Однако фаги и хромосомы представляют собой сравнительно сложные объекты и их исследование связано со значительными трудностями. Именно этим объясняется тот факт, что имеющиеся в настоящее время данные о вторичной и третичной структуре ДНК *in vivo* во многом противоречивы. Один из подходов к решению этой проблемы состоит в изучении модельных систем (²⁻⁴), в которых ДНК имеет различную пространственную структуру, поскольку изучение вторичной и третичной структуры ДНК в таких системах может дать информацию о конформационных возможностях двойной спирали *in vivo*. Наиболее прямым и надежным методом исследования структуры является, как известно, метод рентгеноструктурного анализа монокристаллов. Однако в настоящее время не существует способа получения стабильных, хорошо упорядоченных монокристаллов ДНК, имеющих размеры достаточно большие для проведения рентгеноструктурных исследований. В работе (⁵) описано получение кристаллов ДНК с молекулярным весом 250 000—500 000, путем осаждения ее из разбавленных растворов этанолом. Однако размер полученных таким методом кристаллов не превышал 40 мкм (⁶). Кроме того, как показывает опыт (⁷), использование летучих осаждающих агентов не обеспечивает возможности получения достаточно устойчивых кристаллов.

В данной работе для кристаллизации ДНК мы использовали цетавлон — цетилтриметиламмоний-бромид (ЦТА-Br), поскольку известно, что растворимость цетавлоновых солей полианионов (и, в частности, цетавлоновой соли ДНК — ДТА-ДНК) можно значительно понизить, уменьшая концентрацию одновалентных катионов в растворе. Ранее использование цетавлона позволило получить кристаллы ряда индивидуальных тРНК (⁸).

Для кристаллизации использовали ДНК тимуса теленка, выделенную по модифицированному методу (⁹) и фрагментированную до молекулярного веса 300 000—500 000. Кристаллы выращивали в пробирках или в каплях на силиконизированных предметных стеклах, помещенных в герметически закрывающиеся прозрачные камеры при температуре 23—27°. Кристаллизационный раствор содержал следующие компоненты: ДНК (100 о.е./мл); 0,01 M MgCl₂; 0,001 M CoCl₂; 0,01 M трис-HCl-буфер, pH 7—7,5; ЦТА-Br и NaCl в концентрации, достаточной для растворения

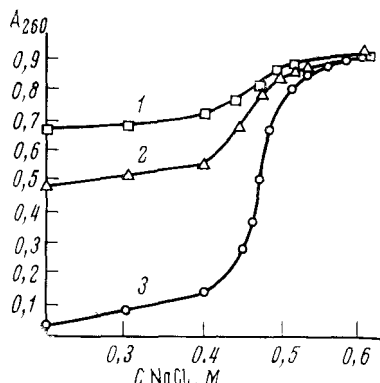


Рис. 1. Зависимость растворимости ЦТА-ДНК от концентрации NaCl в кристаллизационном растворе. Молярное отношение ЦТА-Br к фосфатным остаткам ДНК составляет: 1 — 1/4; 2 — 1/2; 3 — 1

ЦТА-ДНК (см. ниже). На дно камер наливали раствор NaCl, концентрацию которого выбирали, исходя из кривых растворимости соли ЦТА-ДНК в кристаллизационном растворе. Кривые растворимости (рис. 1) были получены при различном молярном соотношении между ЦТА-Вг и фосфатными остатками ДНК (1 : 4, 1 : 2, 1 : 1). Вследствие диффузии паров воды концентрация NaCl в каплях (пробирках) постепенно понижалась, в результате чего начиналась кристаллизация ЦТА-ДНК. Максимальный размер кристаллов ДНК, которые нам

удалось получить при помощи этого метода, достигал 1 мм. Кристаллы были достаточно стабильны и не разрушались как в процессе приготовления образцов для рентгеновских исследований, так и под действием рентгеновского излучения в течение нескольких суток. В зависимости от состава кристаллизационного раствора и режима осаждения могут быть получены кристаллы ДНК различного типа (сферолиты, дендриты и другие формы вплоть до ограненных кристаллов). На рис. 2, в качестве примера, приведена фотография кристаллов ДНК, выращенных в течение 1 мес. в режиме медленного осаждения. Следует отметить, что денатурированные теплом молекулы ДНК в аналогичных условиях осаждались в виде аморфного осадка, не образуя кристаллов (рис. 2 и 3 см. вкл. к

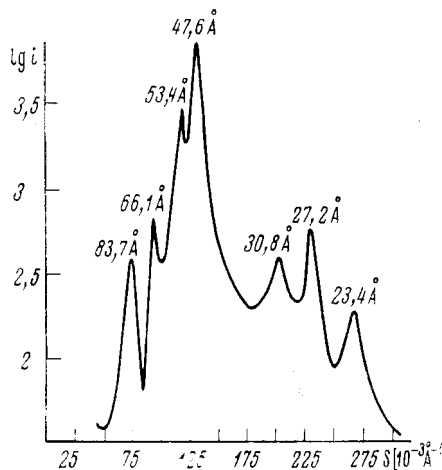


Рис. 4. Кривая малоуглового рассеяния поликристаллического образца ЦТА-ДНК, полученная после введения поправки на целевую коллимацию

стр. 705.

Было проведено сравнение свойств исходного препарата ДНК и препарата ДНК, полученного из кристаллов путем их отделения от маточного раствора, растворения и отмывки ДНК от цетавлона. Электронно-микроскопические фотографии этих двух препаратов оказались идентичными. Они плавилась практически при одинаковой температуре, причем для препарата ДНК, полученного из кристаллов, величина гиперхромного эффекта была обычно несколько большей, чем для исходного препарата, а интервал плавления несколько уже. Не исключено, что наблюдаемые различия обусловлены тем, что в процесс кристаллизации вовлекаются преимущественно молекулы близкого молекулярного веса, а резко отличающиеся по молекулярному весу и частично денатурированные молекулы ДНК остаются в растворе.

Рентгеноструктурный анализ кристаллов ДНК проводили при помощи специальной рентгеновской камеры, позволяющей получать рентгенограммы одновременно в больших и малых углах (¹⁰), а также малоугловой установки типа «Амур» со целевой коллимацией. Поликристаллические образцы представляли собой плотные осадки кристаллов ДНК, выделенные в результате центрифугирования их концентрированной взвеси непосредственно в капиллярах. Использовали рентгеновские кварцевые капилляры с диаметром 0,3–1 мм.

На рис. 3 в качестве примера приведена рентгенограмма, полученная от кристаллов, показанных на рис. 2, при съемке под малыми углами. Видны два наиболее отчетливых рефлекса с периодами $d_1=45$ Å и $d_2=26$ Å, два слабых кольца с периодами $d_3=54$ Å и $d_4=30$ Å, а также размытая полоса, границы которой соответствуют периодам 150 Å и 80 Å. Поскольку отношение $d_1/d_2=\sqrt{3}$, можно предположить, что эти два рефлекса характеризуют плоскую гексагональную решетку с параметром $a=2d_2=52$ Å. Воз-

можно, что молекулы (или группы молекул) ДНК расположены параллельно друг другу в узлах такой решетки. На рентгенограмме, снятой при больших углах, видны размытые кольца, соответствующие периодам 3,3 Å, 4,1 Å и 7,5 Å. Кривая малоуглового рассеяния, полученная на том же образце, приведена на рис. 4. Наблюдаемые максимумы с периодами $d_1' = 47,6$ Å, $d_2' = 27,2$ Å, $d_3' = 53,4$ Å и $d_4' = 30,8$ Å аналогичны соответствующим рефлексам на малоугловой рентгенограмме (рис. 3). Интерпретация всех остальных максимумов в настоящее время не является однозначной.

Для сравнения с рентгенограммой от кристаллов ДНК была получена также рентгенограмма ориентированного волокна соли ЦТА-ДНК при относительной влажности 95–98%. Для комплекса ЦТА-ДНК в области малых углов характерен лишь рефлекс с периодом 51 Å. Небольшая экваториальная ориентация этого рефлекса позволяет предположить, что он является упаковочным и характеризует расстояние между молекулами комплекса ЦТА-ДНК в экваториальной плоскости.

Приведенные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что в полученных нами кристаллах ДНК имеется хорошая упорядоченность в расположении молекул (более высокая, чем в ориентированном волокне), что открывает возможность рентгеноструктурного исследования отдельных монокристаллов и определения способа упаковки молекул ДНК в кристалле.

Выражаем благодарность чл.-корр. АН СССР Б. К. Вайнштейну и А. А. Чернову за интерес к работе и плодотворные дискуссии. Благодарим А. Д. Мирзабекова и Д. Саянко за помощь в освоении метода кристаллизации тРНК, а также Я. М. Варшавского и Ю. М. Евдокимов за ценные критические замечания в ходе обсуждения результатов.

Физико-технический институт низких температур
Академии наук СССР
Харьков

Поступило
28 V 1975

Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова
Академии наук СССР
Москва

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуцдино Московской обл.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Бендич, Г. Розенкранц, Сб. Нуклеиновые кислоты, М., 1965.
- ² Ю. М. Евдокимов, Н. М. Акименко и др., Молекулярная биол., т. 7, в. 1, 151 (1973).
- ³ G. D. Fasman, B. Schaffhausen et al., Biochemistry, v. 9, 2814 (1970).
- ⁴ M. Haynes, R. A. Garrett, W. B. Gratzer, Biochemistry, v. 9, 4410 (1970).
- ⁵ G. Giannoni, F. Padden, H. D. Keith, Proc. Acad. Sci. U.S.A., v. 62, 964 (1969).
- ⁶ L. S. Lerman, Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., v. 38, 1974, p. 59.
- ⁷ В. Р. Мелик-Адамян, Т. Н. Жуляева, Сб. Молекулярная биология, т. 2, М., 1973.
- ⁸ A. D. Mirzabekov, D. Rhodes et al., Nature New Biol., v. 237, № 70, 27 (1972).
- ⁹ Г. П. Георгиев, Биохимия, т. 24, 472 (1959).
- ¹⁰ В. И. Герасимов, Д. Я. Цванкин, Приборы и техн. эксп., т. 2, 204 (1968).