

УДК 577.323

## ВЛИЯНИЕ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ РАСТВОРИТЕЛЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК НА ПРОЦЕСС ЕЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ

О. В. Давыдова, С. И. Каргов

*(кафедра физической химии)*

Методами кондуктометрии и спектрофотометрии исследован процесс термической денатурации ДНК в интервале концентраций  $C_p = 1.2 \cdot 10^{-4} - 2.6 \cdot 10^{-3}$  М в водно-этанольных и водно-диоксановых растворах. Показано, что температура плавления ДНК зависит от природы добавляемого органического растворителя и является нелинейной функцией диэлектрической проницаемости раствора. Первоначальное добавление органического растворителя приводит к значительному уменьшению температуры плавления ДНК, причем этот эффект нивелируется с увеличением концентрации ДНК. Дальнейшее уменьшение диэлектрической проницаемости раствора сопровождается плавным и практически линейным изменением температуры плавления ДНК.

Известно, что гидрофобные эффекты играют важную роль в биологических системах [1]. В частности, гидрофобные взаимодействия являются одним из главных факторов, контролирующих создание и поддержание необходимой конформации природных макромолекул, а также их взаимодействие с другими (макро)молекулами, и, таким образом, способствуют поддержанию их нормальной биологической активности. Сложность биологических систем приводит к необходимости изучения подобных эффектов в более простых модельных системах.

В качестве одной из таких модельных систем можно рассматривать раствор ДНК в водно-органических смесях. Исследование процесса термической денатурации ДНК в таких системах может пролить свет на многие аспекты гидрофобных взаимодействий с участием этой важнейшей биомолекулы.

В данной работе методами кондуктометрии и спектрофотометрии исследован процесс термической денатурации ДНК в водно-этанольных и водно-диоксановых растворах с различными значениями диэлектрической проницаемости.

### Экспериментальная часть

Использовали препарат Na-ДНК из эритроцитов цыплят (*Reanal*) без дополнительной очистки.

Для приготовления исходного раствора навеску ДНК растворяли в  $1 \cdot 10^{-3}$  М растворе NaCl. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически.

Во всех экспериментах использовали бидистиллированную воду, дополнительно очищенную на установке «Milli-Q» (*Millipore*), с удельной электропроводностью не более

$1 \cdot 10^{-6}$  Ом<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. Использовали этанол и диоксан квалификации «х.ч.».

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре «Lambda 2» (*Perkin Elmer*). Для получения кривых плавления образцы нагревали со скоростью 1 град/мин с помощью термoelementa РТР-1. Значения температуры и оптического поглощения регистрировали с помощью персонального компьютера.

Сопротивление растворов измеряли на прецизионном кондуктометре «Conductolyzer 5300 В» (LKB) с точностью  $\pm 0.25\%$  при частоте переменного тока 2 кГц. Использовали термостатированную проточную ячейку с постоянной, равной  $0.73$  см<sup>-1</sup> при 25°.

Для расчета структурных характеристик ДНК из кондуктометрических данных использовали подход, основанный на теории Маннинга [2] для растворов полиэлектролитов, который подробно описан нами в предыдущих работах этой серии [3–6].

В расчетах учитывали зависимость от температуры вязкости и диэлектрической проницаемости воды, а также предельной подвижности низкомолекулярных коионов и противоионов [7, 8]. Для этого использовали аппроксимации соответствующих температурных зависимостей полиномами третьей степени, позволяющие в выбранном температурном интервале достичь совпадения аппроксимирующих значений с экспериментальными с точностью более 0.1%.

Для расчета значений диэлектрической проницаемости раствора с разными концентрациями этанола и диоксана при разных температурах соответствующие литературные данные [9] аппроксимировали полиномами 4-й степени.

Для определения температуры плавления ДНК спектрофотометрические и кондуктометрические кривые плавления дифференцировали по температуре и находили максимум на дифференциальной кривой.

Расчеты проводили на компьютере IBM-PC/AT с помощью программ, написанных на языке BASIC.

### Обсуждение результатов

При спектрофотометрическом исследовании процесса термической денатурации ДНК ( $C_p = 0.6 \cdot 10^{-4}$  М) в смешанных растворах вода – диоксан и вода – этиленгликоль было показано [10], что температура плавления ДНК линейно уменьшается с уменьшением диэлектрической проницаемости раствора независимо от природы органического растворителя. В дальнейшем, проведя исследования в растворах с более высокими концентрациями диоксана и этиленгликоля, авторы установили [11], что такая линейная зависимость имеет место только при уменьшении диэлектрической проницаемости раствора до определенного предельного значения ( $\epsilon \approx 58$  для этиленгликоля и  $\epsilon \approx 50$  для диоксана). При этом значении на зависимостях  $T_{пл}$  от  $\epsilon$  наблюдаются изломы, и при более низких значениях диэлектрической проницаемости раствора кривые перестают совпадать между собой. Показано, что совпадения кривых можно добиться и при значениях  $\epsilon$  ниже критических,

если строить график зависимости температуры плавления ДНК не от диэлектрической проницаемости, а от объемной доли воды в растворе. На основании этого факта авторы пришли к выводу, что при высоких концентрациях органического растворителя в растворе определяющим фактором температуры плавления ДНК является не диэлектрическая проницаемость, а объемная доля воды.

В настоящей работе исследовали процесс термической денатурации ДНК в водно-органических смесях при нескольких концентрациях ДНК в интервале  $C_p = 1.2 \cdot 10^{-4} - 2.6 \cdot 10^{-3}$  М. Использование наряду с традиционным спектрофотометрическим методом кондуктометрии, который, как было показано ранее [3–6], является удобным и информативным при изучении конформационных превращений в концентрированных растворах биополимеров, позволило провести исследования в широком интервале концентраций ДНК.

На рис. 1, 2 представлены полученные нами экспериментальные данные по зависимости температуры плавления ДНК в водно-этанольных и водно-диоксановых растворах от диэлектрической проницаемости раствора в точке плавления при различных концентрациях ДНК.

Из рисунков видно, что в отличие от данных [11] излом на зависимости для сопоставимых концентраций ДНК наблюдается сразу при добавлении даже небольших количеств органического растворителя. После первоначального резкого падения  $T_{пл}$  наблюдается ее плавный рост, причем ход кривых  $T_{пл}$  для водно-этанольных и водно-диоксановых растворов различен, т.е. зависит от природы добавляемого органического растворителя.

Авторы [11] объясняют линейную зависимость  $T_{пл}$  от  $\epsilon$  тем, что при уменьшении  $\epsilon$  среды усиливается электростатическое отталкивание отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК, что облегчает процесс денатурации.

На рис. 3 представлены данные по изменению среднего расстояния  $b$  между заряженными группами полииона ДНК в процессе термической денатурации в присутствии разных добавок органического растворителя, рассчитанные из кондуктометрических данных. Аналогичные результаты получены нами и при других концентрациях ДНК. Из рисунка видно, что величина  $b$  изменяется монотонно в зависимости от содержания органического растворителя. Таким образом, начальное резкое падение  $T_{пл}$  нельзя объяснить изменением структуры ДНК при добавлении органического растворителя.

Вероятно, начальное резкое падение  $T_{пл}$  ДНК объясняется изменением структуры раствора (воды) уже при небольших добавках органического растворителя, что приводит к облегчению образования новых водородных связей между расплетенными после денатурации цепями ДНК и водным окружением. Дальнейшее добавление органического растворителя не приводит к кардинальным изменениям этой структуры, что выражается в плавном измене-

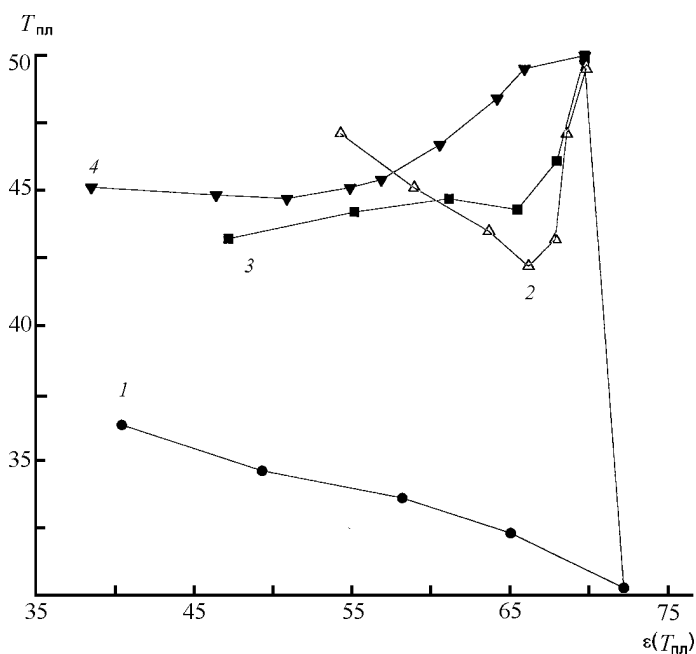


Рис. 1. Зависимость температуры плавления ДНК в водно-диоксановых растворах от диэлектрической проницаемости раствора в точке плавления при различных концентрациях ДНК ( $C_p$ , М): 1 –  $1.2 \cdot 10^{-4}$  (спектрофотометрические данные), 2 –  $0.65 \cdot 10^{-3}$ , 3 –  $1.3 \cdot 10^{-3}$ , 4 –  $2.6 \cdot 10^{-3}$  (кондуктометрические данные)

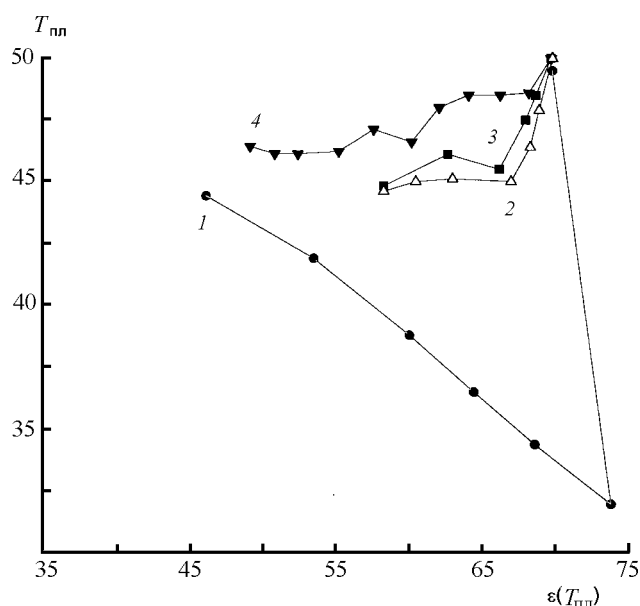


Рис. 2. Зависимость температуры плавления ДНК в водно-этанольных растворах от диэлектрической проницаемости раствора в точке плавления. Обозначения те же, что и на рис. 1.

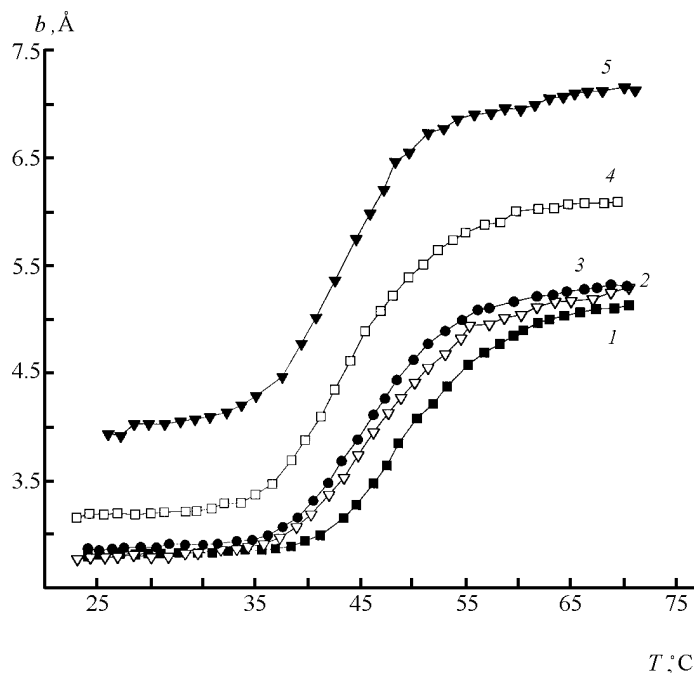


Рис. 3. Зависимость среднего расстояния между зарядами вдоль оси полииона ДНК ( $C_p = 1.75 \cdot 10^{-3}$  М) от температуры при различных добавках диоксана, %: 1 – 0, 2 – 5, 3 – 10, 4 – 20, 5 – 30

нии  $T_{пл}$  ДНК. Интересно, что эффект резкого уменьшения  $T_{пл}$  при первом добавлении органического растворителя нивелируется с ростом концентрации ДНК, и при  $C_p = 2.6 \cdot 10^{-3}$  М кривая зависимости  $T_{пл}$  от  $\epsilon$  не содержит изломов (рис. 1, 2). Одним из вероятных объяснений может служить так называемый «эффект самозащиты» ДНК, проявляющийся с ростом ее концентрации [12].

Остается неясной причина расхождения полученных нами данных с данными работ [10, 11]. Отсутствие начального излома нельзя объяснить влиянием концентрации ДНК, поскольку концентрация ДНК в работах [10, 11] была близка ( $6 \cdot 10^{-5}$  М) к таковой в наших спектрофотометрических экспериментах ( $1.2 \cdot 10^{-4}$  М). Более того, поскольку этот эффект усиливается с уменьшением концентрации ДНК, то резкий начальный излом должен был проявиться в работах [10, 11] еще более ярко. Возможно, отсутствие начального излома объясняется тем, что авторы работ [10, 11] проводили исследования в  $1.5 \cdot 10^{-3}$  М цитратном буфере, в то время как в наших экспериментах буфер отсутствовал. По-видимому, действие буфера аналогично повышению концентрации ДНК и также сглаживает начальный излом. Тем не менее этот факт заслуживает дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-03-32302а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кесслер Ю.М., Зайцев А.Л. // Сольвофобные эффекты. Теория, эксперимент, практика. Л., 1989.
2. Manning G.S. // J. Phys. Chem. 1981. **85**. Р. 1506.
3. Давыдова О.В., Каргов С.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, Химия. 1997. **38**. С. 38.
4. Давыдова О.В., Каргов С.И., Козлов А.Г. // ЖФХ. 1996. **70**. С. 330.
5. Козлов А.Г., Давыдова О.В., Каргов С.И. // ЖФХ. 1993. **67**. С. 1692.
6. Козлов А.Г., Давыдова О.В., Каргов С.И. // ЖФХ. 1993. **67**. С. 1697.
7. Харнед Г., Оуэн Б. // Физическая химия растворов электролитов. М., 1952.
8. Справочник по электрохимии / Под ред. А. М. Сухотина. Л., 1981.
9. Timmermans J. // The Physico-Chemical Constants of Binary Systems in Concentrated Solutions. N.Y., 1960.
10. De Hammar Oro J.R., Grigera J.R. // Stud. Biophys. 1987. **120**. Р. 51.
11. De Hammar Oro J.R., Grigera J.R. // J. Biol. Phys. 1995. **21**. С. 151.
12. Auer H.E., Alexandrowicz Z. // Biopolymers. 1969. **8**. Р. 1.