

антикодоном (см. гл. 9). Следует подчеркнуть, однако, что в функционировании нуклеиновых кислот кинетические факторы играют, вероятно, более важную роль, чем термодинамические.

§ 8.4. ТЕРМОДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ СПИРАЛЬ — КЛУБОК

Денатурация нуклеиновых кислот сводится к разрушению двойной спирали. По-видимому, в клетке только тРНК обладают фиксированной третичной структурой.

Нагревание раствора нативной ДНК при некоторых значениях рН и ионной силы вызывает разделение двойной спирали на две цепи, сворачивающиеся в статистические клубки. При этом значительно уменьшаются вязкость и оптическая активность, исчезает гипохромизм, т. е. возрастает интенсивность полосы поглощения в области 2600 Å (см. стр. 498) [75]. Разделение на две цепи непосредственно доказывается центрифугированием ДНК, содержащей N^{15} , в градиенте плотности CsCl (см. стр. 153). Клетки *E. coli*, выращенные в среде, содержащей N^{15} , переносились в среду с обычным N^{14} . При делении клеток образывались редуцированные двойные спирали, в которых одна цепь содержала N^{15} , другая — N^{14} . До денатурации наблюдался один пик плотности 1,717 г/см³, отвечающий двойным спиральям N^{15} — N^{14} . После денатурации появляются два пика, а именно: 1,740 и 1,724 г/см³, отвечающие одонитевым клубкам соответственно с N^{15} и N^{14} . Плотность повышается, так как клубки более компактны, чем спираль [76]. Прямые определения молекулярного веса ДНК показывают, что при денатурации он уменьшается вдвое [75, 77]. Образование клубков при денатурации непосредственно наблюдается в электронном микроскопе (рис. 8.15).

Как и в случае полиаминокислот (см. § 4.5), переход спираль — клубок может рассматриваться как плавление спирали. Простейшая модель для изучения этих процессов — синтетический гомополинуклеотид, содержащий комплементарные пары только одного сорта, например Поли-А — Поли-У. Такая двойная спираль плавится при 65°C в 0,15 М растворе NaCl при рН 7,0. Интенсивность полос поглощения при 2600 Å увеличивается на 34%, а удельное вращение $[\alpha]_D$ убывает на 275°.

Как и следует ожидать, температура плавления ДНК возрастает с увеличением относительного содержания Г — Ц — эти нуклеотиды связаны сильнее, чем А — Т (см. § 8.3). Зависимость $T_{пл}$ от содержания Г — Ц линейна [78]. Экстраполяция этой прямой дает предельные значения $T_{пл} = 69^\circ\text{C}$ для Поли-АТ и 110°C для Поли-ГЦ, хорошо согласующиеся с экспериментальными значениями для соответствующих синтетических полинуклеотидов (65 и 104°C). Температура плавления ДНК растет

с увеличением ионной силы раствора приблизительно пропорционально логарифму концентрации катионов.

Теория плавления простейших моделей — гомополинуклеотидов развита в ряде работ [79—82] (см. также монографии [6, 83, 84]).

В области перехода молекула состоит из чередующихся спиральных и неупорядоченных участков. Если обозначить число разорванных пар через N_1 , число связанных пар через N_2 и

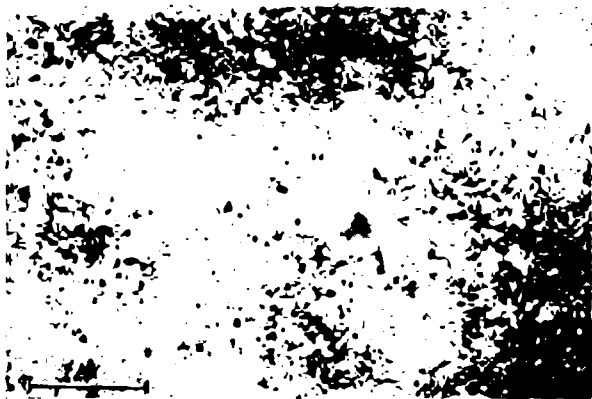


Рис. 8.15. Электронная микрофотография денатурированной ДНК.

число спиральных участков (равное числу неупорядоченных участков) через n , то свободная энергия системы запишется в виде

$$F(N_1, N_2, n) = N_1 F_1 + N_2 F_2 + n F_s - T S_0, \quad (8,4)$$

где F_1 и F_2 — свободные энергии полностью разделенных и полностью спиральных молекул, отнесенные к одной паре оснований, F_s — энергия, необходимая для возникновения расплавленной области между двумя спиральными. Образование расплавленного участка, содержащего m пар, происходит в результате разрыва m поперечных и $m + 1$ продольных связей. Наконец, S_0 есть энтропия смешения спиральных и неспиральных участков

$$S_0 = R \ln \frac{N_1!}{n! (N_1 - n)!} \frac{N_2!}{n! (N_2 - n)!}; \quad (8,5)$$

F имеет минимум при некотором значении n , удовлетворяющем условию

$$[N_1/n - 1][N_2/n - 1] = 1/\sigma, \quad (8,6)$$

где $\sigma = \exp(-F_s/RT)$ — фактор кооперативности (ср. стр. 210).

Равновесные значения N_1 , N_2 и n определяются условием, полученным путем минимизирования F при постоянном значении $N_1 + N_2 = N$

$$\frac{1 - n/N_2}{1 - n/N_1} = s \equiv \exp \frac{F_1 - F_2}{RT}. \quad (8,7)$$

Кривая плавления, т. е. зависимость доли неупорядоченных пар $1 - \theta = N_1/N$ (θ — степень спиральности) от T , идет тем круче, чем меньше σ . При $\sigma = 1$ кооперативность отсутствует, при $\sigma = 0$ кооперативность полная. Температурный интервал перехода спираль — клубок ΔT (рис. 8.16) определяется условием

$$\Delta T = \frac{1}{|d\theta/dT|_{\max}}, \quad (8,8)$$

и расчет, основанный на модели Изинга (ср. стр. 209), дает

$$\Delta T = 4\sigma^{1/2} \frac{RT_{\text{пл}}^2}{\Delta H}, \quad (8,9)$$

где ΔH — разность энтальпий спиральной и неспиральной молекулы в расчете на пару оснований. Более строгая теория должна учесть то обстоятельство, что неупорядоченный участок образует замкнутую петлю, которая может быть и асимметричной [81, 82]. Уточненный расчет дает

$$\Delta T = \frac{16\pi^{1/3}}{3} (2\sigma)^{1/3} \frac{RT_{\text{пл}}^2}{\Delta H}. \quad (8,10)$$

Из экспериментальных значений ΔT для синтетических гомополинуклеотидов находят $\sigma \sim 10^{-4} - 10^{-5}$, т. е. $F_s \approx 7$ ккал/моль. Как мы видим, степень кооперативности весьма высока.

Подробный анализ ситуации для гетерополимеров, проведенный Лазуркинским, Франк-Каменецким и их сотрудниками, не только позволил построить теорию, применимую к ДНК и ее комплексам с малыми молекулами, но и привел к созданию метода исследования структуры нуклеиновых кислот [85].

Рассмотрение гетерогенности требует учета двух факторов — добавочного укрепления или ослабления двойной спирали лигандами и различной стабильности пар А — Т и Г — Ц. Эти факторы должны трактоваться по-разному — лиганды перераспределяются по цепи в процессе плавления, а первичная структура остается неизменной.

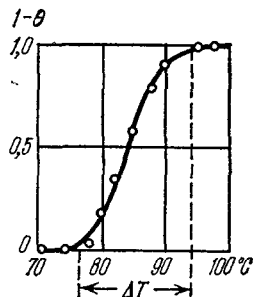


Рис. 8.16. Переход спираль — клубок в ДНК — изменение степени спиральности θ с повышением температуры.

Влияние обратимого связывания лигандов на плавление гомополимеров рассмотрено в работах [82, 85, 86]. Допустим, что m_1 молекул лиганда связано неспиральными и m_2 — спиральными участками полимера. Вместо (8,4) имеем

$$F(N_1, N_2, n, m_1, m_2) = N_1 F_1 + N_2 F_2 + n F_s + m_1 \psi_1 + m_2 \psi_2 - TS_0 - RT \ln \frac{N_1!}{m_1! (N_1 - m_1)!} \frac{N_2!}{m_2! (N_2 - m_2)!}, \quad (8,11)$$

где ψ_1 и ψ_2 — свободные энергии лиганда на участках 1 и 2. Уравнение (8,11) отвечает случаю невзаимодействующих лигандов. Условие минимума $\partial F/\partial n = 0$ совпадает с (8,6), т. е. средняя длина спиральных участков при данном θ не зависит от присутствия лигандов. С другой стороны, из условия $\partial F/\partial N_1 = 0$ вместо (8,7) получается

$$\frac{1 - n/N_2}{1 - n/N_1} = s^* \equiv s \frac{1 - c_1}{1 - c_2}, \quad (8,12)$$

где $c_1 = m_1/N_1$, $c_2 = m_2/N_2$. Эти концентрации лигандов выражаются через концентрацию лиганда в растворе c_0 и константы связывания K_1 и K_2 следующим образом:

$$K_1 = \frac{c_1}{c_0(1 - c_1)}, \quad K_2 = \frac{c_2}{c_0(1 - c_2)}. \quad (8,13)$$

Кривая плавления гомополимера без лигандов описывается функцией

$$\theta = f(s). \quad (8,14)$$

Можно положить $\theta = 0,5$ при $s_{пл} = 1$. При наличии лигандов

$$\theta = f(s^*) \quad (8,15)$$

и $\theta = 0,5$ при $s^* = 1$, т. е. при $s_{пл} = (1 - c_2)/(1 - c_1)$. Сдвиг температуры плавления по сравнению с температурой плавления для чистого полимера T_0 определяется как

$$\delta\left(\frac{1}{T_{пл}}\right) = \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_{пл}} = \frac{R_0}{\Delta H} \ln\left(\frac{1 - c_1}{1 - c_2}\right). \quad (8,16)$$

Изменение интервала температур плавления

$$\delta\left(\frac{\Delta T}{T_{пл}^2}\right) = \frac{\Delta T}{T_{пл}^2} - \frac{\Delta_0 T}{T_0^2} = -\frac{R}{\Delta H} \left[\frac{\partial}{\partial \theta} \ln\left(\frac{1 - c_1}{1 - c_2}\right) \right]_{\theta=1/2}. \quad (8,17)$$

Если лиганды находятся в избытке в растворе, то

$$\delta\left(\frac{1}{T_{пл}}\right) = \frac{R}{\Delta H} \ln\left(\frac{1 + K_2 D}{1 + K_1 D}\right), \quad (8,18)$$

где D — полная концентрация лигандов в растворе. Величина $\delta(\Delta T/T_{пл}^2)$ в этом случае равна нулю. Напротив, при прочном

связывании лигандов полимером во всей области перехода, т. е. при $K_1 p \gg 1$ или $K_2 p \gg 1$ (p — концентрация связывающих фосфатных групп полинуклеотида),

$$\delta T_{пл} = 2 \left(\frac{p-1}{p+1} \right) \frac{RT_0^2}{\Delta H} c, \quad (8,19)$$

$$\delta \Delta T = 4 \left(\frac{p-1}{p+1} \right)^2 \frac{RT_0^2}{\Delta H} c, \quad (8,20)$$

где $p = K_2/K_1$, $c = 2D/p$. Последние две формулы справедливы для малых c . Теория описывает и общий случай [85]. Таким образом, при $p > 1$ лиганды действуют в качестве «скрепок», стабилизирующих двойную спираль.

Опыт подтверждает приведенные выше соотношения. Уравнение (8,18) хорошо описывает влияние рН на кривые плавления. С его помощью при высоких ионных силах и нейтральных рН найдено значение ΔH , варьирующее в пределах 10—11 ккал/моль [87]. Уравнения (8,19) и (8,20) согласуются с данными, полученными для комплексов ДНК (из фага Т2) с акридиновыми красителями и актиномицином при низких ионных силах [88, 89]. Изложенная выше теория была с успехом применена также к исследованию комплексов ДНК с рибонуклеазой [85].

Ионы щелочных металлов, а также Ag^+ , Cu^+ , связываются ДНК и стабилизируют ее структуру [90—93]. Ионы Ag^+ и Cu^+ могут перераспределяться по молекуле, преимущественно связываясь с парами Г — Ц. Исследования связывания ионов металлов позволили определить ΔH , равное $8,1 \pm 1$ при 0,01 М NaCl и $11,0 \pm 2$ ккал/моль при 0,1 М той же соли [93]. Эти и другие определения ΔH , основанные на изложенной теории, хорошо согласуются с результатами прямых микрокалориметрических измерений, дающих $\Delta H \approx 9$ ккал/моль [94] (см. также ниже, стр. 517).

Обратимся теперь к плавлению двуспирального гетерополимера. Такое плавление в принципе может происходить с образованием петель или без их образования [85]. Общая теория плавления для моноспирального гетерополимера (скажем, полиаминокислоты) дана в работах [95—97] (см. § 4.5). Теория для двойной спирали исходит из беспорядочного распределения пар А — Т и Г — Ц. Указанная на стр. 507 линейная зависимость $T_{пл}$ от содержания пар Г — Ц согласуется с этим предположением.

Особенность гетерополимера состоит в относительно малом числе микросостояний, отвечающих данной энергии. Маловероятно, чтобы два разных распределения клубков и спиралей по цепи с теми же значениями N_1 , N_2 и n имели одинаковую

энергию, так как они почти наверняка будут содержать разное число пар Г—Ц в расплавленных участках. Поэтому энтропия смешения не может существенно влиять на плавление гетерополимеров. Вместе с тем должен появиться новый энергетический фактор, определяемый тем, что при уменьшении средней длины расплавленных участков содержание в них более стабильных пар Г—Ц должно уменьшаться. Конкуренция этого фактора и фактора, обусловленного невыгодностью «стыков» спиральных и неспиральных участков, должна приводить к чередованию спиральных и неспиральных участков определенной средней длины при данном значении θ .

Приближенное решение задачи о плавлении гетерополимера с беспорядочной последовательностью пар дано в [85]. Разделим молекулу на одинаковые отрезки, каждый из которых содержит λ пар. Если λ достаточно велико, то распределение содержания пар по этим отрезкам будет гауссовым, т. е.

$$P_\lambda(x) = \frac{1}{(2\pi)^{1/2} \sigma_\lambda} \exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_\lambda^2}\right), \quad (8,21)$$

где $\sigma_\lambda^2 = x_0(1-x_0)/\lambda$; x — содержание пар Г—Ц.

Общее число пар Г—Ц в расплавленных участках минимально, если все отрезки с концентрацией этих пар, меньшей некоторого предельного значения x_λ , расплавлены и все отрезки с $x > x_\lambda$ спиральны. Тем самым значение x_λ определяется условием

$$\int_0^{x_\lambda} P_\lambda(x) dx = N_1/N. \quad (8,22)$$

Средняя концентрация Г—Ц в расплавленных участках \bar{x}_1 равна

$$\bar{x}_1 = \frac{\int_0^{x_\lambda} x P_\lambda(x) dx}{\int_0^{x_\lambda} P_\lambda(x) dx} = \frac{N}{N_1} \int_0^{x_\lambda} x P_\lambda(x) dx. \quad (8,23)$$

Так как состав каждого данного отрезка не зависит от состава других, вероятность того, что расплавленная область состоит из k отрезков, следующих друг за другом, равна

$$(1 - N_1/N) (N_1/N)^{k-1} \quad (8,24)$$

и среднее число отрезков в расплавленной области

$$\bar{k} = \frac{1}{1 - N_1/N}. \quad (8,25)$$

Среднее число пар оснований в этой области

$$\bar{m}_1 = \lambda \bar{k}. \quad (8,26)$$

Число расплавленных участков во всей молекуле

$$n = \frac{N_1}{\lambda \bar{k}} = N_1 \frac{1 - N_1/N}{\lambda}. \quad (8,27)$$

Свободная энергия полимера равна

$$F(N_1, N_2, n) = N_1 [\bar{x}_1 F_1^{\Gamma\text{Ц}} + (1 - \bar{x}_1) F_1^{\text{АТ}}] + \\ + N_2 [\bar{x}_2 F_2^{\Gamma\text{Ц}} + (1 - \bar{x}_2) F_2^{\text{АТ}}] + n F_s. \quad (8,28)$$

Вводя условия $N_1 + N_2 = N$, $\bar{x}_1 N_1 + \bar{x}_2 N_2 = x_0 N$, обозначая $\Delta F_{\Gamma\text{Ц}} = F_1^{\Gamma\text{Ц}} - F_2^{\Gamma\text{Ц}}$, $\Delta F_{\text{АТ}} = F_1^{\text{АТ}} - F_2^{\text{АТ}}$ и переходя от переменной n к переменной λ , получаем в пренебрежении постоянными членами

$$F(N_1, \lambda) = N_1 \bar{x}_1 \Delta F_{\Gamma\text{Ц}} + N_1 (1 - \bar{x}_1) \Delta F_{\text{АТ}} + \frac{N_1}{\lambda} \left(1 - \frac{N_1}{N}\right) F_s. \quad (8,29)$$

\bar{x}_1 и x_λ определены (8,23) и (8,22). Равновесные значения N_1 и λ находят из соответствующих условий минимума F . Анализ выражения для F в области перехода, т. е. вблизи $N_1/N = 1/2$, производится путем разложения в ряд по переменной $\epsilon \equiv N_1/N - 1/2$. Пользуясь уравнением (8,29) и вновь отбрасывая постоянные члены, получаем

$$F(N_1, \lambda) = N \left\{ \epsilon \Delta F - \frac{1}{(2\pi)^{1/2}} \left[\frac{x_0(1-x_0)}{\lambda} \right]^{1/2} (\Delta F_{\Gamma\text{Ц}} - \Delta F_{\text{АТ}}) (1 - \pi \epsilon^2) + \right. \\ \left. + \frac{F_s}{4\lambda} (1 - 4\epsilon^2) \right\}, \quad (8,30)$$

где

$$\Delta F = x_0 \Delta F_{\Gamma\text{Ц}} + (1 - x_0) \Delta F_{\text{АТ}}. \quad (8,31)$$

Из условия $\partial F / \partial \lambda = 0$ (при $\epsilon = 0$) находим

$$\lambda_0 = \frac{\pi}{2} \left(\frac{F_s}{\Delta F_{\Gamma\text{Ц}} - \Delta F_{\text{АТ}}} \right)^2 \frac{1}{x_0(1-x_0)}. \quad (8,32)$$

Поскольку

$$\Delta F_{\Gamma\text{Ц}} - \Delta F_{\text{АТ}} = (T_{\Gamma\text{Ц}} - T_{\text{АТ}}) \Delta H_{\text{АТ}} / T_{\text{АТ}}, \quad (8,33)$$

где $T_{\Gamma\text{Ц}}$ и $T_{\text{АТ}}$ — температуры плавления для соответствующих полимеров, имеем

$$\bar{m}_1 = \pi \left[\frac{T_{\text{АТ}}}{\Delta H_{\text{АТ}}} \frac{F_s}{(T_{\Gamma\text{Ц}} - T_{\text{АТ}})} \right]^2 \frac{1}{x_0(1-x_0)}. \quad (8,34)$$

Приравняв нулю производную свободной энергии по $\bar{\epsilon}$ при постоянном λ и продифференцировав полученное выражение по T , находим

$$\Delta T = 2 \frac{\pi - 2}{\pi} \frac{\Delta H_{AT}}{T_{AT}} \frac{(T_{ГЦ} - T_{AT})^2}{F_s} x_0 (1 - x_0). \quad (8,35)$$

Строгое решение задачи отличается от приведенного лишь численными множителями [98]. Образование петель при плавлении учитывается добавочным членом в F , отвечающим энтропии петель [85].

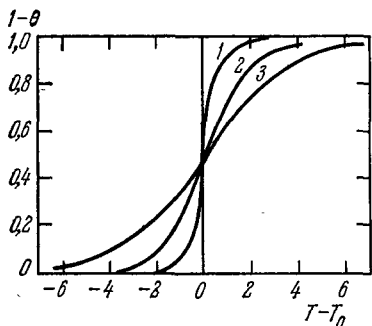


Рис. 8.17. Зависимость θ полигетеронуклеотида от T .

- 1 — $x_0 = 0$, $T_{пл} = 340^\circ\text{К}$, $N = 2 \cdot 10^4$;
 2 — $x_0 = 0,1$, $T_{пл} = 344^\circ\text{К}$, $N = 4 \cdot 10^4$;
 3 — $x_0 = 0,5$, $T_{пл} = 360^\circ\text{К}$, $N = 6 \cdot 10^4$.

$= 340^\circ\text{К}$, $T_{ГЦ} = 380^\circ\text{К}$, $\Delta H_{AT} = 7 \text{ ккал/моль}$, $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$, $N = 2 \cdot 10^4 - 10^6$. Линейная зависимость $T_{пл}$ от x_0 получается непосредственно

$$T_{пл} = T_{AT} + (T_{ГЦ} - T_{AT}) x_0. \quad (8,36)$$

Эти расчеты проведены без учета образования петель. Такой учет приводит к некоторому уменьшению ΔT [85, 100].

Форма теоретической кривой плавления согласуется с опытом практически независимо от модели. Напротив, теоретический график для ΔT существенно зависит от принятой модели и от выбранных значений параметров. Все они, кроме σ , находятся из независимых экспериментов. Прекрасное согласие с опытом для ряда типов ДНК получено при $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$ [85]. Тем самым, опыт позволяет найти σ .

Определения оптической плотности (и, следовательно, степени спиральности θ) и размеров молекулы ДНК в растворе путем измерения характеристической вязкости в процессе термической денатурации позволили найти средние длины спиральных участков независимым путем [101]. В согласии с теорией в области $\theta = 0,8 - 0,9$ длины спиральных отрезков варьируют

от 1000 до 2500 пар, тогда как в области перехода, т. е. при $\theta = 0,5$ $\bar{m} = 400-500$ пар.

$T_{пл}$ понижается и ΔT увеличивается с уменьшением длины цепи [102]. Теория этого явления развита в работе [103] и подтверждена экспериментально [104].

Описанные результаты позволяют на основе измерения кривых плавления обнаруживать дефекты вторичной структуры

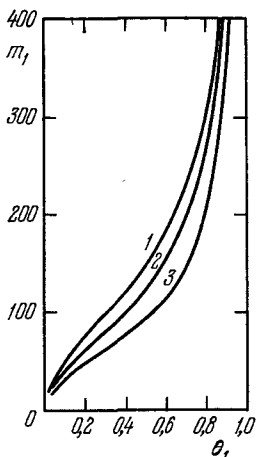


Рис. 8.18. Зависимость среднего числа пар оснований в расплавленных участках от $\theta_1 = 1 - \theta$. Кривые 1-3 отвечают тем же параметрам, что и на рис. 8.17.

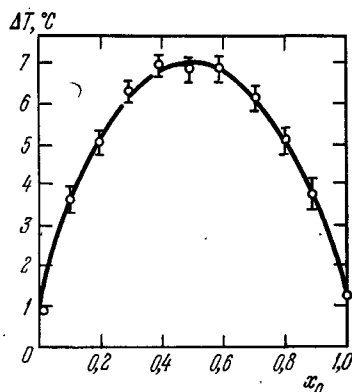
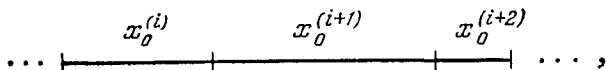


Рис. 8.19. Зависимость интервала температур плавления от концентрации пар $\Gamma-\Pi$.

ДНК и определять их концентрацию. Ультрафиолетовое облучение вызывает расширение кривых $\theta(T)$ вследствие локальной денатурации [105]. Наличие дефектов доказывается кинетическими опытами [106], число дефектов оценивается путем калибровки термодинамического метода с помощью фрагментированной ДНК [104].

Особенно интересна возможность установить характер распределения нуклеотидов по цепи путем исследования перехода спираль — клубок. Установлено, что ДНК ряда умеренных фагов содержит области, различающиеся по концентрации пар $\Gamma-\Pi$ [107]. Это отражается в появлении ступенек на кривой плавления и в распределении фрагментированных молекул ДНК при центрифугировании в градиенте плотности. Такую блочную гетерогенность можно исследовать путем параллельного изучения кривых плавления и зависимости характеристической вязкости от T в области перехода [107].

Пусть блочная последовательность имеет вид



причем внутри блока пары Г — Ц распределены беспорядочно. Обычно исследуемые фрагменты ДНК, именуемые молекулами, содержат $n_0 = 1000—50\,000$ пар нуклеотидов. В этой области значений n_0 кривые $\theta(T)$ не зависят от n_0 . Напротив, кривые зависимости характеристической вязкости $[\eta]$ от T зависят от n_0/n_B , где n_B — средняя длина блока. Если $n_B \ll n_0$, то каждая молекула в растворе содержит большое число блоков с различным содержанием пар Г — Ц. Поэтому при плавлении каждая молекула будет распадаться на спиральные и неупорядоченные участки без полного разделения цепей вплоть до последних стадий плавления. Кривые $[\eta](T)$ смещены к меньшим температурам по сравнению с кривыми $\theta(T)$, так как образование малого числа коротких расплавленных участков, расположенных далеко друг от друга, уменьшает размер молекулы. Это происходит вследствие малости размеров неупорядоченных участков и сближения спиральных участков, а также потому, что возникают добавочные резкие изломы, уменьшающие размер статистического сегмента.

Если $n_B \gg n_0$, то молекулы существенно различаются содержанием пар Г — Ц. ΔT для каждого сорта молекул меньше, чем общая ΔT для их смеси. В области плавления большая часть молекул будет либо полностью спиральной, либо полностью расплавленной. Следовательно,

$$[\eta] = [\eta]_1 \theta_1 + [\eta]_2 (1 - \theta_1), \quad (8,37)$$

где $\theta_1 = 1 - \theta$ — степень неупорядоченности, и если молекулы либо полностью спиральны, либо полностью расплавлены, то

$$\theta_1 = g = \frac{[\eta]_2 - [\eta]}{[\eta]_2 - [\eta]_1}. \quad (8,38)$$

На рис. 8.20 показаны зависимости $g(T)$ и $\theta_1(T)$ для разных видов ДНК, а на рис. 8.21 — зависимость $g(\theta_1)$ [85, 101]. Кривые для высших организмов близки к следующей из уравнения (8,38); для *E. coli* и фага T2 это не так. Следовательно, ДНК высших организмов свойственна блочная гетерогенность. Эти результаты позволяют оценить нижний предел размеров блока из условия $n_B \gg n_0$. Молекулярные веса ДНК высших организмов равнялись по порядку величины 10^9 , средний вес блока несомненно превышал 10^7 .

Таким образом, внимательное изучение кривых плавления ДНК дает ценные сведения о ее структуре. Надо думать, что этот метод окажется полезным и для изучения РНК.

Лифшиц провел детальное теоретическое рассмотрение зависимости формы кривой плавления ДНК от последовательности пар А — Т и Г — Ц [108]. Показано, что в идеале исследование кривой плавления ДНК может дать ценную информацию об ее

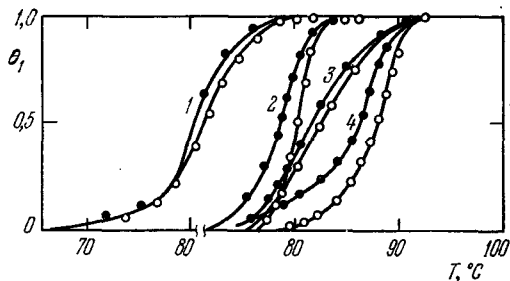


Рис. 8.20. Зависимость относительных изменений $[\eta]$ (зачерненные кружки) и оптической плотности (светлые кружки) от T .

1 — ДНК из спермы сельди, 2 — из фага Т2, 3 — из тимуса теленка, 4 — из *E. coli*.

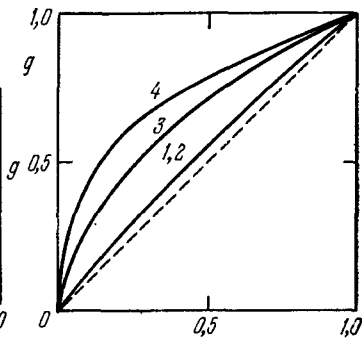


Рис. 8.21. Зависимость g от θ_1 — доли расплавленных пар оснований.

1 — ДНК из спермы сельди, 2 — из тимуса теленка, 3 — из *E. coli*, 4 — из фага Т2.

первичной структуре. Однако современная экспериментальная точность для этого недостаточна.

Термодинамические характеристики денатурации ДНК были определены методом микрокалориметрии в работах Привалова [94, 109, 110]. Теплота денатурации сильно зависит от рН. При возрастании рН от 7,0 до 9,7 величина $T_{пл}$ убывает от 84,8 до 66,3 °С, ΔH — от 9650 до 7140 кал/моль, ΔS — от 27 до 21 э. е. При убывании рН от 5,4 до 3,2 $T_{пл}$ убывает от 84 до 55 °С, ΔH — от 9400 до 4000 кал/моль, ΔS — от 25,6 до 12,4 э. е. Значение $T_{пл}$ сильно меняется с ионной силой, ΔH мало зависит от ионной силы и, следовательно, от температуры. Разность свободных энергий денатурированной и нативной ДНК при 37 °С убывает от 1250 до 620 кал/моль при возрастании рН от 7,0 до 9,7 и от 1240 до 220 кал/моль при убывании рН с 5,4 до 3,2. При рН 7,0 ΔF убывает от 1250 до 710 кал/моль при возрастании рNa от 0,84 до 2,04. Свободная энергия стабилизации нативной структуры ДНК линейно зависит от активности NaCl. Логарифмическая зависимость ΔF от ионной силы при постоянном рН

показывает, что механизм стабилизации спирали одновалентными ионами имеет энтропийный характер. По-видимому, число связанных макромолекулой противоионов определяется линейной плотностью зарядов на цепи и не зависит от концентрации противоионов в растворе. При денатурации плотность зарядов на

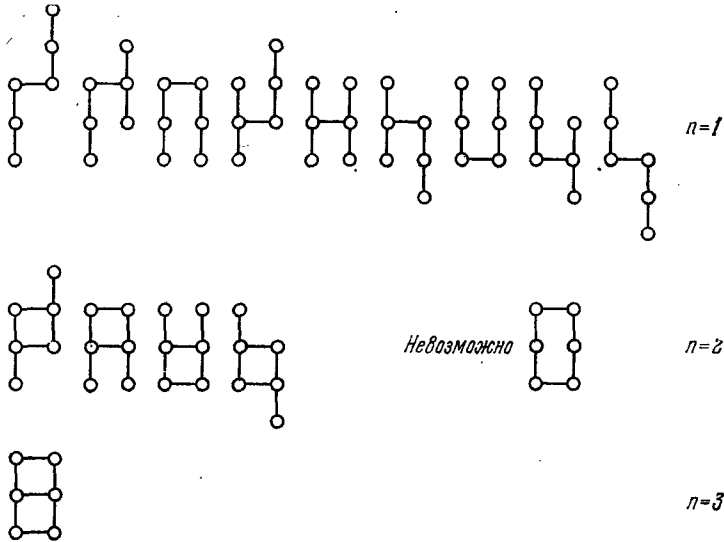


Рис. 8.22. Модели спаривания тринуклеотидов.

цепи понижается, противоионы уходят в раствор и изменяется энтропия.

Детальное исследование термодинамики переходов спираль — клубок проведено на простейших моделях — на олигорибоадениловых кислотах [111, 112]. При низких рН олигоаденины образуют двойные спирали, начиная с тетрануклеотида. Возможные модели спаривания тринуклеотидов, предложенные в работе [111], показаны на рис. 8.22. Вообще говоря, число разных двойных спиралей с n связанными парами при данной степени полимеризации N равно $(N - n + 1)^2$. Переходы изучались по гипохромному эффекту при 2650 \AA для N от 6 до 10. Образование двойной спирали из двух цепей характеризуется двумя константами — константой нуклеации β и константой роста спирали s . Константа $s = \exp(-\Delta H/RT + \Delta S/R)$. Константа равновесия для перехода две цепи \rightleftharpoons двойная спираль равна

$$K = \beta \sum_{n=1}^N (N - n + 1)^2 s^n \equiv \beta L(s) \equiv \beta s [N^2 - (2N^2 + 2N - 1)s + (N + 1)^2 s^2 - s^{N+1} - s^{N+2}] / (1 - s)^3. \quad (8,39)$$

Доля спаренных нуклеотидов составляет [113]

$$\theta = \frac{s \{1 + 4\gamma L - (1 + 8\gamma L)^{1/2}\} L'}{4\gamma N L^2}, \quad (8,40)$$

где $L' = dL/ds$, $\gamma = \beta c$ (c — общая молярная концентрация как свободных, так и связанных цепей). При $s \gg 1$ (большое разбавление) $L(s) \rightarrow s^N$ и

$$\theta = \frac{1 + 4\gamma s^N - (1 + 8\gamma s^N)^{1/2}}{4\gamma s^N}. \quad (8,41)$$

В средней точке перехода $\theta = 0,5$ и $\gamma s^N = 1$. Острота перехода в этой точке

$$\left(\frac{d\theta}{d \ln s}\right)_{T_{пл}} = 1/6N. \quad (8,42)$$

Следовательно,

$$\left(\frac{d\theta}{dT}\right)_{T_{пл}} = \frac{N \Delta H}{6RT_{пл}^2}, \quad (8,43)$$

т. е. ΔH можно определить по наклону кривой $\theta(T)$ при $T_{пл}$. Значения $T_{пл}$ возрастают с увеличением c . Если $\theta = \text{const}$, то $\gamma s^N = \text{const}$, если $\theta = 0,5$, то $\gamma s^N = 1$. Имеем $(\partial \ln s / \partial \ln \gamma)_{\theta, N} = -1/N$ и

$$\left(\frac{\partial T}{\partial \ln \gamma}\right)_{\theta, N} = -\frac{RT^2}{N \Delta H}. \quad (8,44)$$

Интегрируя это уравнение от c до c' при постоянном β , находим

$$\frac{1}{T'} = \frac{1}{T} + \frac{R}{N \Delta H} \ln \frac{c'}{c}. \quad (8,45)$$

Зависимость $T_{пл}$ от длины цепи следует из $(\gamma s^N)_{пл} = 1$; имеем

$$\frac{1}{T_{пл}} = \frac{1}{T_c} + \frac{R \ln \gamma}{N \Delta H}. \quad (8,46)$$

Тщательные измерения, проведенные в работе [112], дали при $N = 6, 7, 8, 9$ и 10 $\Delta H = 5,85; 6,7; 7,5; 8,1; 8,9$ ккал/моль соответственно. Необходимо, однако, учесть статистическое распределение полимеров по различным значениям n , наличие вертикальных взаимодействий и в единичных цепях (это дает $\Delta S_{ст} \approx \approx 26$ э. е. и $\Delta H_{ст} = 6,1; 5,4; 4,4; 4,1; 4,0$ ккал/моль при $N = 6, 7, 8, 9, 10$), а также протонирование цепей. Единичные цепи протонированы при рН 4,2 на 10%, двуспиральные олигомеры — на 80% [113, 114]. При таком изменении протонирования (на 70%) $\Delta H_{пр} = 2,2$ ккал/моль. Учет этих поправок при $\beta = 10^{-3}$ л/моль дает для $N = 6, 7, 8, 9, 10$ значения ΔH , равные соответственно

10,0; 10,2; 10,2; 10,6; 11,4 ккал/моль. Дальнейший анализ показал, однако, что предположение о независимости β от T не согласуется с опытом. Из эксперимента следует, что от T не зависит β . Учет этого обстоятельства дает значение ΔH , независимое от N и равное $11,8 \pm 0,6$ ккал/моль пар оснований. Величина β составляет $3 \cdot 10^4$ л/моль.

Евдокимов и Варшавский исследовали плавление ДНК в легкой и тяжелой воде в широком интервале значений рН — от 2 до 12 [115]. График зависимости $T_{пл}$ от рН имеет колоколообразную форму с плато при 80—85°C (ДНК фага Т2) в интервале рН 4,5—8,5 и резкое падение $T_{пл}$ при больших и меньших рН (при ионной силе 0,18—0,25). При нейтральных рН температуры плавления ДНК в H_2O и D_2O совпадают. Отсюда следует, что водородные связи не определяют стабильность ДНК. В кислой области более устойчива Н-ДНК, а в щелочной — D-ДНК. Различна и зависимость температур плавления Н-ДНК и D-ДНК от ионной силы при низких ее значениях ($\sim 0,01$). Этот эффект можно объяснить различиями в степени гидратации, меньшей в D_2O . Из экспериментальных данных получены следующие значения ΔH и ΔS : при 37% пар Г—Ц $\Delta H = 8,0$, $\Delta S = 23,0$; при 40% $\Delta H = 8,7$, $\Delta S = 25,4$; при 48% $\Delta H = 9,5$ ккал/моль пар оснований, $\Delta S = 27,4$ э. е. Значения для H_2O и D_2O практически совпадают.

В работе [116] калориметрическим и оптическим методами изучена кислотная денатурация ДНК, определяемая протонизацией азотистых оснований. Установлено возникновение некоторой промежуточной конформации ДНК, отличной как от нативной, так и от денатурированной.

Обзор теории переходов спираль — клубок в ДНК дан в работе [117].

§ 8.5. КИНЕТИКА ДЕНАТУРАЦИИ ДНК

Кинетика расплетания двойной спирали ДНК была впервые рассмотрена Куном [118] (см. также [6]). Как показал Кун, если допустить что раскручивание (возникшее после разрыва связей между цепями) происходит в результате вращательного броуновского движения, то этот процесс потребует времени τ , гораздо большего, чем наблюдаемое. Так, для ДНК с м. в. $3 \cdot 10^6$ раскручивание 450 витков спирали, что необходимо для полного разделения, требует 150 дней. Между тем τ для ДНК с м. в. порядка 10^8 составляет около 1 мин. Кун считал, что раскручивание происходит на концах спирали, но не учитывал свертывания в клубки освободившихся цепей. Если отвлечься от их неизбежного перепутывания, то τ для расплетания цепей, свертывающихся в клубки, получится существенно меньшим [6, 119]. Кун