

10,0; 10,2; 10,2; 10,6; 11,4 ккал/моль. Дальнейший анализ показал, однако, что предположение о независимости  $\beta$  от  $T$  не согласуется с опытом. Из эксперимента следует, что от  $T$  не зависит  $\beta$ . Учет этого обстоятельства дает значение  $\Delta H$ , независимое от  $N$  и равное  $11,8 \pm 0,6$  ккал/моль пар оснований. Величина  $\beta$  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  $\Delta H$  и  $\Delta S$ : 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  $\tau$ , 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  $\tau$  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  $\tau$  для расплетания цепей, свертывающихся в клубки, получится существенно меньшим [6, 119]. Кун

рассмотрел разделение цепей, происходящее при сочетании вращательного теплового движения с поступательным, и получил для ДНК с м. в.  $3 \cdot 10^6$   $\tau = 58$  сек, что также слишком много.

Лонгет-Хиггинс и Зимм учли вращательный момент цепи, создаваемый увеличением энтропии у разделившихся цепей [120]

$$P = \frac{T \Delta S}{\varphi} = \frac{57,3}{36} T \Delta S; \quad (8,47)$$

$\varphi = 36^\circ/57,3^\circ$  — выраженный в радианах угол, на который нужно повернуть конец цепи для освобождения одной пары оснований. Скорость раскручивания, т. е. относительная угловая скорость двух половин спирали  $\omega = P/b$ , где  $b$  — коэффициент трения. Для спиралей с м. в. порядка  $10^6$   $\tau$  оказывается порядка секунд. Эта оценка не учитывает необратимости развертывания и переплетания освободившихся цепей.

Фиксман рассмотрел одновременное действие куновского (диффузионного) и энтропийного механизма [121]. Крозерс также исследовал сочетание обоих механизмов, но учел возможность одновременного плавления в разных точках молекулы, а не только на ее концах [122]. Особый интерес представляет работа Фонга [123]. Перепутывание свободных цепей не должно возникать, если разрыв цепей происходит в средней точке спирали. Две ее половины флуктуируют независимо, половину времени они развертываются, половину — скручиваются вновь. Однако на начальных стадиях процесса ввиду плотной упаковки спирали вторичное скручивание невозможно и кинетическая энергия скручивания превращается в потенциальную, способствующую раскручиванию. Если произошло много поворотов, возможно обратное скручивание. Таким образом, две половины спирали беспорядочно скручиваются и раскручиваются без изменения радиуса спирали. Но скручивание не может продолжаться неопределенно долго, и поэтому при таком беспорядочном движении происходит преимущественно развертывание спирали. Число поворотов  $N(t)$  при  $t > 0$ , следовательно, меньше или равно начальному числу поворотов спирали  $N_0$ . Задача состоит в нахождении  $\tau$  для условия

$$\int_0^{\tau} \omega(t) dt = -2\pi N_0, \quad (8,48)$$

где  $\omega(t)$  — относительная угловая скорость двух половин спирали. Если  $N(t) = N_0$ , то  $\omega(t_-) = -\omega(t_+)$ . Можно оценить нижний и верхний пределы  $\tau$ . Среднее значение  $\omega(t)$  в некотором интервале времени  $\bar{\omega}(t)$  есть монотонно убывающая функция  $t$ , так как для развертывания двойной спирали с удвоенным числом оборотов, требуется более чем удвоенное время. Нижний

предел  $\tau$  получится при замене  $\bar{\omega}(t)$  начальным максимальным значением  $\bar{\omega}(0)$ . Пусть начальная относительная угловая скорость равна  $\omega_0$ . Если обе половины спирали развертываются, то  $\omega(0) = 2\omega_0$ . Так как в момент  $t = 0$  ДНК развертывается половину времени, то  $\bar{\omega}(0) = \frac{1}{2}\omega(0) = \omega_0$ . Эта величина находится из условия

$$\frac{1}{2}J\omega_0^2 = \frac{1}{2}kT, \quad (8,49)$$

где  $J$  — момент инерции половины спирали относительно ее оси. При  $N_0 = 2 \cdot 10^4$  (м. в.  $1,2 \cdot 10^8$ , число пар оснований  $2 \cdot 10^5$ ) и  $20^\circ\text{C}$   $\omega_0 = 3 \cdot 10^8$  рад/сек. Нижний предел  $\tau$  равен

$$\tau_n = 2\pi N_0 / \bar{\omega}(0) = 4,2 \cdot 10^{-4} \text{ сек.}$$

Верхний предел,  $\tau_b$  отвечает хаотическому свертыванию и развертыванию без преимущества для последнего процесса. Считаем, что молекула ДНК находится в воде при  $20^\circ\text{C}$ . Средний вращательный момент  $P_{1/2}$  половины молекулы ДНК равен  $1,34 \cdot 10^{-22}$  СГС, момент количества движения молекулы воды  $p = 1,9 \cdot 10^{-18}$  СГС. Умножая  $p$  на радиус спирали, находим (по порядку величины) средний вращательный момент, возникающий вследствие соударения молекулы ДНК с молекулой  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $p' = 1,7 \cdot 10^{-25}$  СГС. Таким образом,  $r = P_{1/2}/p' = 7,8 \cdot 10^2$ . Следовательно, для уменьшения  $P_{1/2}$  до нуля нужно большое число соударений, равное  $r^2$ . Расчет дает  $2 \cdot 10^{15}$  соударений в 1 сек и время, необходимое для  $r^2$  соударений, т. е. для уменьшения углового момента от  $P$  до 0, равно  $3 \cdot 10^{-10}$  сек. Среднее время между двумя последовательными нулями флуктуирующего углового момента  $\bar{t}$  вдвое больше вследствие симметрии флуктуаций во времени. За время  $\bar{t}$  угловая скорость не меняет знака, и можно рассматривать  $\bar{t}$  и число оборотов  $n$  за это время как шаг в броуновском блуждании. Имеем  $n = \omega_0 \bar{t} = 2,9 \cdot 10^{-2}$  оборота и время  $\tau_b$  для  $10^4$  оборотов оказывается равным

$$\tau_b = (10^4/n)^2 \bar{t} = 73 \text{ сек.}$$

Можно показать, что при  $N \gg 1$   $\tau$  близко к верхнему пределу. Это значение согласуется с опытом.

Такой процесс эффективнее куновского, так как в интервале времени  $\bar{t}$  угловая скорость флуктуирует по величине, но не по направлению и нужные повороты происходят один за другим. Рассматривается коллективное движение развернутой части ДНК. Начало развертывания во многих местах спирали, ее фрагментация может только уменьшить  $\tau$ . В модели Фонга не обязательно учитывать вращение освободившихся концов цепей, которые должны быть короткими. Из расчета следует, что  $\tau_b \propto M^3$ , а  $\tau_n \propto M^{3/2}$ . Реальное  $\tau$  может иметь промежуточное значение.

Теория Фонга достаточно груба, но, вероятно, дает правильный порядок величины  $\tau$ , который не должен изменяться при строгом решении стохастической задачи (о развертывании ДНК при редупликации см. стр. 541).

Возможность внутреннего разупорядочения двойной спирали без разделения цепей, по-видимому, действительно существует. В работе [124] наблюдалась денатурация кольцевой двуспиральной ДНК без раскручивания. Время денатурации некольцевой фаговой ДНК (около 25 сек) зависит от молекулярного веса. Для ряда видов фаговых ДНК оно пропорционально  $M^2$ . Квадратичная зависимость следует непосредственно из того, что  $\tau$  должно быть пропорционально числу витков, т. е.  $M$ , и вязкости среды, т. е. также  $M$ . Мэсси и Зимм [125] исследовали денатурацию ДНК релаксационными методами (см. § 7.7) и установили, что  $\tau$  зависит от многих факторов — от стадии перехода спираль — клубок, от ионной силы растворителя и его вязкости, от концентрации ДНК и ее молекулярного веса, а также от числа и расположения разрывов в цепи. Итак,

$$\tau = \alpha(1 + c[\eta])\eta M\psi, \quad (8,50)$$

где  $0 < \psi < 1$  — фактор, характеризующий стадию перехода,  $c$  — концентрация ДНК,  $[\eta]$  — ее характеристическая вязкость,  $\eta$  — вязкость растворителя,  $\alpha$  — константа, зависящая от ионной силы. При малых  $c$  имеем  $\tau \propto M$ . Повышение  $\tau$  от начала перехода к его концу показывает, что сопротивление среды все же возрастает по мере развертывания молекулы. Одновременно вследствие образования петель увеличивается эффективный радиус двойной спирали — обстоятельство, которое не учитывается в теории [123].

Та же релаксационная техника (температурный скачок) применялась к изучению денатурации ДНК в работе [126]. Это исследование показало наличие трех последовательных процессов. При малом температурном скачке (от 6 до 18°C) сначала возникает «мгновенный» ответ ( $\tau < 20$  мсек), состоящий в быстрой структурной дезорганизации спирали без разделения цепей. Дезорганизация должна начинаться в участках с избытком пар А — Т. За мгновенным ответом следует постепенная деспирализация, которую авторы назвали быстрым эффектом. Длительность этого процесса пропорциональна  $M^{2,3}$ . Далее малые температурные возмущения в области перехода проявляются в весьма медленном кинетическом эффекте, характеризующемся большой энергией активации ( $\sim 100$  ккал/моль) и практически не зависящем от молекулярного веса. Он может быть истолкован как явление нуклеации в кооперативном переходе, т. е. как уничтожение спиральных участков, разделяющих неупорядоченные.

Очевидно, что кинетика плавления нативной ДНК отвечает целому спектру времен релаксации. Подлинная теория явления еще не построена и наталкивается на большие трудности при исследовании кинетической связи между достижением внутреннего равновесия и раскручиванием. В предыдущих расчетах это не учитывалось, так как раскручивание считалось лимитирующей стадией. В действительности же процесс может лимитироваться «сплавлением» дезорганизованных участков спирали.

Варшавский и Евдокимов изучали расплетание ДНК методом теплового удара (ср. стр. 474). Раствор ДНК в течение 0,5 сек нагревался на 5—20°C (в зависимости от ионной силы). Кинетические кривые свидетельствуют о наличии двух или даже трех стадий структурного перехода. В первой, быстрой, стадии возникает почти весь гиперхромный эффект. Полу период всего перехода меняется в зависимости от условий в пределах от нескольких секунд до нескольких десятков секунд. Константа скорости следует уравнению Аррениуса. Расплетание спирали происходит с наибольшей скоростью при экстремальных рН — зависимость энергии активации от рН колоколообразна. Максимальное значение  $E^* = 170$  ккал/моль отвечает рН 7,5 (ионная сила 0,18—0,25); оно падает до 20—25 ккал/моль при рН 3 и 10,5. Авторы интерпретируют первую стадию как образование неподвижных петель и считают, что полное расплетение происходит во второй стадии. Время расплетания возрастает с увеличением молекулярного веса. Полученные результаты показывают, что характер зависимости  $\tau$  от  $M$  определяется ионной силой раствора, числом и распределением разрывов цепей [127—129].

Лазуркин и его сотрудники разработали кинетический формальдегидный метод (КФМ), основанный на изучении кинетики раскручивания, для определения дефектов во вторичной структуре ДНК [85, 128].

Если в растворе содержится вещество, реагирующее с локально деспирализованными нуклеотидами и препятствующее образованию ими уотсон-криковских пар, то реакция будет протекать вплоть до полной деспирализации. Если время связывания такого реагента сильно превышает время раскручивания, то именно эта реакция лимитирует скорость раскручивания. Константа скорости реакции нативной ДНК с реагентом равна  $\omega \tilde{k} = k$ , где  $\omega$  — вероятность разделения для любой пары нуклеотидов в молекуле, а  $\tilde{k}$  — константа скорости реакции разделенных нуклеотидов с указанным реагентом. Если некоторые из оснований нативной ДНК прореагировали и образовали локально денатурированный участок, вероятность тепловой денатурации примыкающих к этому участку нуклеотидов  $\omega' \gg \omega$ . Константа скорости реакции этих пар значительно больше  $k' = \omega' \tilde{k}$ .

Образование локально денатурированного отрезка требует свободной энергии  $F_s$  (см. стр. 508). Поэтому  $k/k' = w/w' \approx \approx \exp(-F_s/RT) = \sigma \sim 10^{-4} - 10^{-5}$ . Так как  $k \ll k'$ , раскручивание, идущее вначале медленно, постепенно ускоряется и кинетическая кривая должна иметь S-образную форму. Наличие дефектов в двойной спирали приводит к увеличению начального наклона этой кривой. Определим ее форму.

Обозначим через  $W(x, t)$  вероятность того, что в момент  $t$  отрезок, содержащий  $x$  пар, целиком спирален. Допустим, что молекула содержит  $N$  пар и находится на некоторой стадии раскручивания. Степень спиральности в момент  $t$  равна

$$\theta = W(x, t), \quad (8,51)$$

в момент  $t + dt$  —

$$W(x, t + dt) = W(x + 2k' dt, t) [1 - (x + y - 1)k dt], \quad (8,52)$$

так как для полной спиральности отрезка, содержащего  $x$  пар в момент  $t + dt$ , необходимо, чтобы в момент  $t$  каждый конец отрезка имел «резерв» по длине, не меньший чем  $k'dt$ , и в отрезке не возникали бы новые центры раскручивания. Начальные размеры (в числе пар) центра раскручивания обозначены через  $y$ . Уравнение (8,52) можно записать в дифференциальной форме

$$\frac{\partial W}{\partial t} = 2k' \frac{\partial W}{\partial x} - (x + y - 1)kW. \quad (8,53)$$

Решаем его с начальным условием

$$W(x, 0) = f(x).$$

Если молекула ДНК не имеет дефектов, то  $f(x) = 1$ . Если дефекты наличествуют, причем длины спиральных участков распределены между ними случайным образом, то  $f(x) = \exp[-c(x-1)]$ , где  $c = \bar{n}^{-1}$  — концентрация дефектов,  $\bar{n}$  — среднее число пар в спиральном участке. Решение уравнения (8,53) при указанном начальном условии дает [106]

$$\theta = f(1 + 2k't) \exp\{-kyt - kk't^2\}, \quad (8,54)$$

и при беспорядочном распределении дефектов находим

$$\theta = \exp\{-(ky + 2k'c)t - kk't^2\} \quad (8,55)$$

или

$$-\frac{\ln \theta}{t} = ky + 2k'c + kk't. \quad (8,56)$$

На рис. 8.23 и 8.24 показаны кривые (8,55) и (8,56). Пересечение прямой, изображающей зависимость  $-\ln \theta/t$  от  $t$  с осью ординат позволяет определить  $c$ .

Формальдегид является раскручивающим реагентом. Экспериментальные кривые  $\theta(t)$  прекрасно согласуются с теоретическими. Их исследование позволило показать, что ультрафиолетовое облучение ДНК приводит к повышению концентрации дефектов, и найти ее значения. Определены величины  $k'$  (порядка  $2 \text{ мин}^{-1}$ ). Минимальная концентрация дефектов, обнаруживаемая КФМ, составляет один дефект на  $10^4$  пар нуклеотидов — метод очень чувствителен [106].

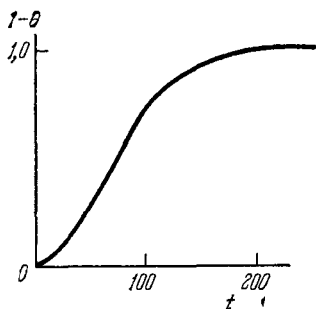


Рис. 8.23. Кинетическая кривая для ДНК с дефектами. По оси абсцисс отложено  $t$  в условных единицах.

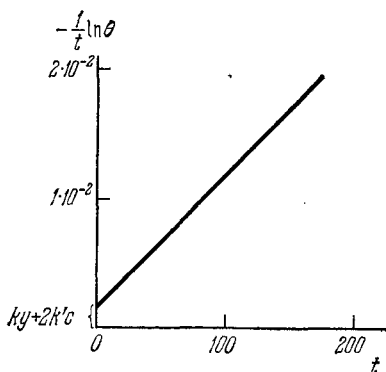


Рис. 8.24. Кинетическая кривая, трансформированная согласно уравнению (8,56). По оси абсцисс отложено  $t$  в условных единицах.

Теория КФМ была уточнена с тем, чтобы учесть различия в значениях  $k$  и  $k'$  в разных точках молекулы [131]. Для гомополимера со «слабыми точками» зависимость  $-\frac{1}{t} \ln \theta$  от  $t$ , вообще говоря, криволинейна. Блочная гетерогенность ДНК также успешно учитывается теорией.

КФМ эффективно применялся для изучения ДНК с разрывами, вызванными панкреатической ДНКазой, к изучению ДНК, подвергшейся ультрафиолетовому облучению, и т. д. Нативная, интактная, ДНК оказалась практически лишённой дефектов или «слабых точек», что опровергает зигзагообразную модель нативной ДНК с резкими изломами и позволяет допустить справедливость червеобразной модели, в которой гибкость цепи определяется малыми поворотами в мономерах. КФМ применим к изучению комплексов ДНК с РНК-полимеразой (см. стр. 565), к изучению тонкой структуры ДНК [131, 132].

Денатурированные, клубкообразные одиночные цепи ДНК способны ренатурироваться, вновь образовывать двуспиральную

дезоксирибонуклеиновую кислоту. Ренатурация ДНК была открыта и изучена Мармуром, Доти и сотрудниками [133, 134]. При медленном охлаждении, т. е. «отжиге», денатурированной ДНК частично восстанавливаются ее биологическая активность (рис. 8.25) и гипохромный эффект. Восстановление оказывается неполным, в частности вследствие деструкции ДНК. Ренатурация происходит и после быстрого охлаждения («закалки») денатурированной ДНК, если вновь подвергнуть такой образец нагреванию до температуры, несколько меньшей  $T_{пл}$ . За ренатурацией удобно следить по изменению плотности с помощью седиментации в градиенте CsCl. Например, плотность нативной ДНК равна  $1,704 \text{ г/см}^3$ , у денатурированной и закаленной в этом состоянии она составляет  $1,716$ , а у ренатурированной —  $1,700 \text{ г/см}^3$ .

Ренатурация должна, очевидно, сильно зависеть от температуры. Для ренатурации необходима температура, достаточно высокая для развертывания клубков и вместе с тем достаточно низкая для стабилизации двойной спирали. Следова-

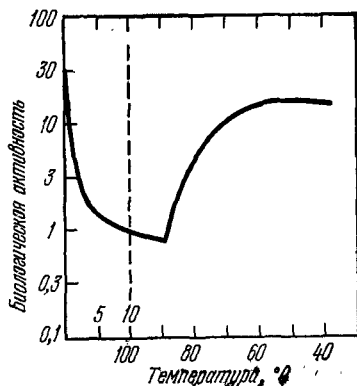


Рис. 8.25. Ренатурация ДНК, Числа над абсциссой 5 и 10 — время выдерживания образца при  $100^\circ\text{C}$ .

тельно, должна существовать оптимальная температура ренатурации. Это действительно так — ДНК из *Diplococcus pneumoniae* ренатурируется при  $67^\circ\text{C}$  в 2,5 раза быстрее, чем при  $80$  и  $50^\circ\text{C}$ .

Ренатурация легко проходит у фаговой ДНК, несколько труднее у бактериальной, но практически неосуществима у ДНК высших организмов. Если бы образцы ДНК, полученные из тимуса телят, клеток *E. coli* и фага T2 все имели молекулярный вес  $10^7$ , то число различных молекул ДНК, приходящееся на одну клетку (или частицу фага), составило бы соответственно  $10^6$ ,  $100$ ,  $10$ . При одинаковой весовой концентрации эти три образца имели бы весьма различные концентрации комплементарных цепей, и вероятность встречи двух таких цепей, возникших при денатурации одной молекулы, в образце, полученном из клеток млекопитающих, была бы очень мала.

Ренатурация позволяет получать гибридные двойные спирали из ДНК различного происхождения. Получены гибриды ДНК, выделенных из различных штаммов *E. coli*, и межбактериальные гибриды [134]. Гибридизация ДНК вскрывает эволюционно-генетические связи между организмами.