

низкая для стабилизации двойной спирали. ДНК из *Diplococcus pneumoniae* ренатурируется при 67°C в 2,5 раза быстрее, чем при 80 и 50°C.

Ренатурация легко проходит у фаговой ДНК, несколько труднее у бактериальной и практически неосуществима у ДНК высших организмов. Это понятно — если бы образцы ДНК, полученные из тимуса теленка, клеток *E. coli* и фага T2, все имели м. м. 10^7 , то число различных молекул ДНК, приходящееся на одну клетку (или частицу фага), составило бы соответственно 10^6 , 10^2 , 10 . При одинаковой весовой концентрации эти три образца имели бы весьма различающиеся концентрации комплементарных цепей, и вероятность встречи двух таких цепей, возникших при денатурации ДНК в образце, полученном из клеток высшего организма, была бы очень мала.

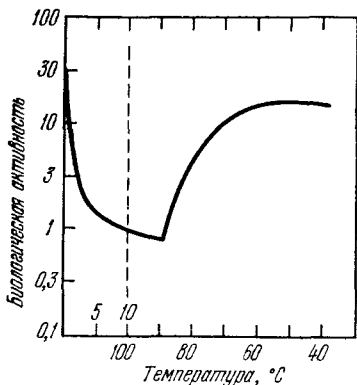


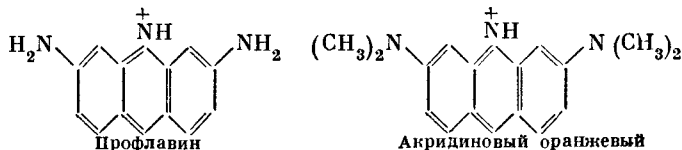
Рис. 7.22. Ренатурация ДНК. Числа над абсциссой 5 и 10 — время выдерживания образца при 100°C

риальные гибриды. Гибридизация ДНК вскрывает эволюционно-генетические связи между бактериями.

Ренатурация позволяет получать гибридные двойные спирали из ДНК различного происхождения. Получены гибриды ДНК, выделенных из различных штаммов *E. coli*, и межвидовые бактериальные гибриды.

§ 7.6. Взаимодействие двойной спирали с малыми молекулами и ионами

Исследование взаимодействия ДНК и РНК с малыми молекулами важно для познания структуры нуклеиновых кислот и ее изменений. Малые молекулы в ряде случаев существенно влияют на биологическую функцию ДНК и РНК. Одни из них являются мутагенами, другие ингибируют транскрипцию (см. § 8.8). К мутагенам относятся, в частности, акридиновые красители, например:



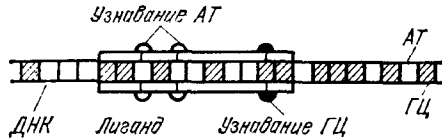
С другой стороны, молекулы белков, которые также малы по сравнению с ДНК, связываясь с ДНК, регулируют основные молекулярно-генетические процессы.

Теория адсорбции малых молекул на ДНК развивалась Крозерсом и Гурским и Заседателевым.

Предположим, что биологически активный лиганд связывается некоторым числом пар оснований ДНК. Рассмотрим равновесное связывание лигандов полимером, представляющим беспорядочную последовательность пар АТ и ГЦ. Лиганд может содержать функциональные группы, часть которых специфически взаимодействует с парами оснований. Пусть α — длина лиганда, q_{AT} и q_{GC} — числа центров на молекулу лиганда, узнающих АТ- и ГЦ-пары. Каждый центр присоединяется к одной паре.

Предположим, что лиганд адсорбируется полимером, если все его центры узнавания связываются с соответствующими парами оснований. Схема такого присоединения показана на рис. 7.23. Значения α , q_{AT} , q_{GC} и константы связывания K могут быть определены из экспериментальной кривой

Рис. 7.23. Схема узнавания двойной спирали ДНК молекулой лиганда



связывания путем ее сравнения с теоретической изотермой, вычисленной с помощью компьютера. Более простая процедура состоит в теоретическом расчете эффективных констант связывания $K_{эф}$, числа связывающих цент-

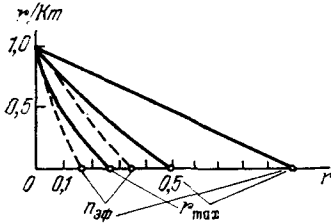


Рис. 7.24. Графики зависимости r/Km от r

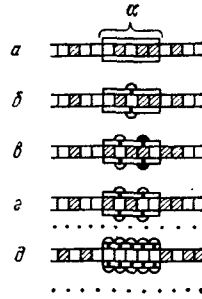


Рис. 7.25. Значения параметра ψ (см. текст)

ров $n_{эф}$ и уровня насыщения для связывания r_{max} . Вычисленные значения сравниваются с экспериментальными с помощью графика Скатчарда (рис. 7.24). Имеем

$$r_{max} = \lim_{m \rightarrow \infty} r, \quad K_{эф} = \left| \lim_{r \rightarrow 0} \frac{d(r/m)}{dr} \right|, \quad n_{эф} = \frac{\lim_{r \rightarrow 0} (r/m)}{K_{эф}}, \quad (7.43)$$

где r — молярное отношение числа связанных лигандов к числу пар оснований ДНК, m — концентрация свободного лиганда в растворе.

Статистическая механика приводит к следующим значениям:

$$r_{max} = \frac{n}{1 + \psi/2}, \quad K_{эф} = K(1 + \psi), \quad n_{эф} = \frac{n}{1 + \psi}, \quad (7.44)$$

где

$$n = x^{q_{AT}} (1 - x)^{q_{GC}}. \quad (7.45)$$

Здесь x — доля пар АТ в полимере, K — истинная константа ассоциации. Параметр ψ учитывает уменьшение числа возможных положений на полимере для второй молекулы лиганда вследствие присутствия первой молекулы. Связывание последовательных лигандов происходит не независимо. Значения параметра ψ показаны на рис. 7.25 (а) $l_{AT} = 0, l_{GC} = 0; \psi = 2(\alpha - 1)$; б) $l_{AT} = 1, l_{GC} = 0; \psi = 2(\alpha - 1)x$; в) $l_{AT} = 1, l_{GC} = 1; \psi = 2(\alpha - 2)x(1 - x)$; г) $l_{AT} = 2, l_{GC} = 0; \psi = 2x + 2(\alpha - 2)x^2; \dots$; д) $l_{AT} = \alpha, l_{GC} = 0; \psi = 2 \sum_{i=1}^{\alpha-1} x^i; \dots$).

Таким образом, например, в случае гомополимера, когда связывание не зависит от отношения АТ/ГЦ, получаем

$$K_{\text{эф}} = K(2\alpha - 1), \quad n_{\text{эф}} = \frac{1}{2\alpha - 1}, \quad r_{\text{max}} = \frac{1}{\alpha}. \quad (7.46)$$

Различие между $n_{\text{эф}}$ и r_{max} количественно объясняется на основе принятой модели. Длина лиганда α может быть определена из экспериментальных значений $n_{\text{эф}}$ и r_{max} . Из изотерм связывания этидиумбромида, спермина, актиномицина и петропсина двойной спиралью ДНК получены значения α , равные соответственно 2, 4, 5 и 5 парам оснований. Эти значения близки к ожидаемым на основе молекулярных размеров лигандов.

Меньшие молекулы типа акридиновых красителей либо прослаиваются между парами оснований в двойной спирали ДНК (модель *интеркаляции* Лермана), либо располагаются в узкой бороздке на поверхности двойной спирали (модель Гурского). По-видимому, встречаются как одни, так и другие комплексы. Эти вопросы обсуждаются далее на с. 290—292.

§ 7.7. Редупликация ДНК

При делении клеток генетический материал удваивается, происходит редупликация двойной спирали ДНК. В принципе возможны три механизма редупликации: *консервативный* с сохранением исходной двойной спирали и построением дочерней двойной спирали, тождественной исходной; *полуконсервативный*, при котором две дочерних двойных спирали содержат каждая по одной новой и по одной старой цепи; и, наконец, *дисперсный* механизм с распределением исходного материала между четырьмя цепями двух дочерних двойных спиралей. Месельсон и Сталь (1958) изучали редупликацию ДНК при делении клеток *E. coli* с помощью меченых атомов и седиментации в градиенте плотности CsCl. Была получена популяция клеток, меченных ^{15}N . Эти клетки переносились в среду, содержащую ^{14}N , но не ^{15}N , и в ней делились. Из исходной популяции, из популяций «детей» и «внуков» извлекались молекулы ДНК и определялись их плотность и радиоактивность. Исходная ДНК, меченная ^{15}N , имела наибольшую плотность, ДНК «детей» оказалась меченой наполовину и ее плотность равнялась среднему арифметическому плотностей ^{15}N -ДНК и ^{14}N -ДНК. Наконец, ДНК «внуков» разделилась при седиментации на две зоны — зону с ДНК, тождественной дочерней, меченой наполовину, и на зону с немеченой