

рами создана малая разность  $T_{пл}$  за счет различия в концентрации соли. Тонкая структура дифференциальной кривой плавления (ДКП) наблюдаема для не слишком длинных двойных спиралей ДНК, она исчезает, если число пар превышает  $10^5$ .

Теория показывает, что каждому пику на ДКП соответствует плавление сравнительно длинного участка, содержание ГЦ-пар которого таково, что его  $T_{пл}$  совпадает с температурой опыта. Теория объясняет тонкие особенности ДКП. На рис. 7.20, а показана экспериментальная ДКП фага  $\phi$ X174, а на рис. 7.20, б — теоретическая ДКП, вычисленная на основе известной последовательности 5375 нуклеотидов в этой ДНК.

### § 7.5. Кинетика расплетания двойной спирали

Мы пока не касались вопросов о скоростях переходов спираль — клубок. Вопросы эти не тривиальны.

Кинетика расплетания двойной спирали ДНК была впервые исследована Куном (1957). Расплетание возникает после разрыва связей между цепями. Если допустить, что оно происходит в результате вращательного броуновского движения, то этот процесс потребует времени  $\tau$ , гораздо большего, чем наблюдаемое. Так, для ДНК с м. м.  $3 \cdot 10^6$  раскручивание 450 витков спирали, что необходимо для полного разделения, требует 150 дней. Между тем  $\tau$  для ДНК с м. м. порядка  $10^6$  составляет около 1 мин. Кун рассмотрел разделение цепей, происходящее при сочетании вращательного теплового движения с поступательным, и получил для ДНК с м. м.  $3 \cdot 10^6$   $\tau$  порядка 1 мин, что также слишком много.

Время расплетания существенно уменьшается, если учесть вращательный момент, возникающий вследствие увеличения энтропии у разделившихся цепей (Лонгет-Хиггинс и Зимм, 1960). Момент этот равен

$$P = \frac{T\Delta S}{\varphi} = \frac{57,3}{36} T\Delta S, \quad (7.36)$$

$\varphi = 36/57,3$  — 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, есть  $\omega = P/\beta$ , где  $\beta$  — коэффициент трения. Для спиралей с м. м. порядка  $10^6$   $\tau$  оказывается порядка секунд. Эта оценка не учитывает необратимости расплетания и перепутывания освободившихся цепей.

Не останавливаясь на других моделях, обратимся к теории, предложенной Фонгом (1964). Перепутывание свободных цепей не должно возникать, если разрыв межцепных связей происходит в средней точке двойной спирали. Две ее половины флуктуируют независимо, половину времени они расплетаются, половину — сплетаются вновь. Однако на начальной стадии разделения ввиду плотной упаковки спирали вторичное скручивание невозможно и

кинетическая энергия сплетающихся цепей превращается в потенциальную, способствующую расплетанию. 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 расплетание спирали.

Число поворотов  $N(t)$  при расплетании меньше или равно начальному числу поворотов спирали  $N_0$ . Нужно найти  $\tau$  из условия

$$\int_0^{\tau} \omega(t) dt = -2\pi N_0, \quad (7.37)$$

где  $\omega(t)$  — относительная угловая скорость двух половин спирали. Если  $N(t) = N_0$ , то число развертывающих поворотов равно числу свертывающих,  $\omega(t_-) = -\omega(t_+)$ . Можно оценить верхний и нижний пределы  $\tau$ . Среднее значение  $\omega(t)$  в некотором интервале времени  $\bar{\omega}(t)$  есть монотонно убывающая функция  $t$ , так как для расплетания 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  $\bar{\omega}(0) = 2\omega_0$ . Так как в момент  $t = 0$  ДНК половину времени развертывается, половину — свертывается, то  $\bar{\omega}(0) = \frac{1}{2}\omega(0) = \omega_0$ . Эта величина находится из условия

$$\frac{1}{2}I\omega_0^2 = \frac{1}{2}\kappa T, \quad (7.38)$$

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

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

Верхний предел,  $\tau_b$ , отвечает хаотическому свертыванию и развертыванию без преимущества для последнего. Считаем, что двойная спираль ДНК находится в воде при  $20^\circ\text{C}$ . Средний вращательный момент  $P$  половины молекулы с м.м.  $1,2 \cdot 10^8$  равен  $1,34 \cdot 10^{-22}$  ед. СГС, момент количества движения молекулы воды  $p = 1,9 \cdot 10^{-18}$  ед. СГС. Умножая  $p$  на радиус спирали, находим средний вращательный момент, возникающий вследствие соударения молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и ДНК,  $p' = 1,7 \cdot 10^{-25}$  ед. СГС и  $P/p' = q = 7,8 \cdot 10^2$ . Для уменьшения  $P$  до нуля нужно большое число соударений, равное  $q^2$ . Расчет дает  $2 \cdot 10^{15}$  соударений в 1 с и время, необходимое для  $q^2$  соударений, т. е. для уменьшения момента от  $P$  до 0, равно  $3 \cdot 10^{-10}$  с. Среднее время  $\bar{t}$  между двумя последовательными нулями флуктуирующего момента 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  $n = \omega_0 \bar{t} = 2,9 \cdot 10^{-2}$  оборотов, и время  $\tau_b$  для  $10^4$  оборотов равно  $(10^4/n)^2 \bar{t} = 73$  с. При  $N \gg 1$  время  $\tau$  близко к верхнему пределу. Это значение согласуется с опытом. Из расчета следует, что  $\tau_n \sim M^3$ ,  $\tau_b \sim M^{3/2}$  ( $M$  — молекулярная масса).

Опыт дает для ряда фаговых ДНК  $\tau \sim M^2$ . 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 (1969) исследовали денатурацию ДНК

релаксационными методами и установили зависимость  $\tau$  от ряда факторов — от вязкости и ионной силы среды, от концентрации ДНК, ее м. м., стадии перехода спираль — клубок. Имеем

$$\tau = b(1 + c[\eta])\eta_0 M\psi, \quad (7.39)$$

где  $0 < \psi < 1$  — фактор, характеризующий стадию перехода,  $c$  — концентрация ДНК,  $[\eta]$  — ее характеристическая вязкость,  $\eta_0$  — вязкость растворителя,  $b$  — константа, зависящая от ионной силы. При малых  $c$  значение  $\tau \sim M$ . Повышение  $\tau$  от начала перехода к концу показывает, что сопротивление среды возрастает по мере развертывания молекулы. Вследствие образования петель увеличивается эффективный радиус двойной спирали (в теории Фонга это не учитывается).

В действительности кинетика плавления нативной ДНК отвечает целому спектру времен  $\tau$ . Подлинная теория явления еще не построена и наталкивается на большие трудности при исследовании связи между достижением внутреннего равновесия и расплетанием. Дезорганизованные участки спирали могут «сплавляться» вновь.

Варшавский и Евдокимов изучали расплетание ДНК методом теплового удара. Раствор ДНК нагревался от 5 до 20°C в течение 0,5 с. Кинетические кривые свидетельствуют о наличии не менее двух стадий структурного перехода. В первой, быстрой, стадии исчезает почти весь гипохромный эффект. По-видимому, на этой стадии образуются неподвижные петли, полное расплетание которых происходит на второй стадии. Скорость расплетания следует уравнению Аррениуса (с. 173), энергия активации процесса сильно зависит от pH, имея максимальное значение при промежуточных pH.

Экспериментальное изучение кинетики расплетания позволяет определять дефекты во вторичной структуре ДНК. С этой целью Лазуркин с сотрудниками разработали *кинетический формальдегидный метод* (КФМ).

Если в растворе содержится вещество, реагирующее с локально деспирализованными нуклеотидами и препятствующее поэтому образованию имидо-ионных 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  $k = k'w$ , где  $w$  — вероятность разделения для любой пары нуклеотидов в молекуле, а  $k'$  — константа скорости реакции разделенных нуклеотидов с реагентом. Если некоторые из оснований нативной ДНК прореагировали и образовали локально денатурированный участок, вероятность тепловой денатурации примыкающих к этому участку пар сильно возрастает,  $w' \gg w$ . Константа скорости  $k'$  соответственно много больше  $k$ . Образование локально денатурированного отрезка требует свободной энергии  $G_s$  (см. с. 234). Поэтому  $k/k' = w/w' \approx \exp(-G_s/RT) = \sigma \sim 10^{-4} - 10^{-5}$ . Так как  $k \ll k'$ , раскручивание, идущее вначале медленно, постепенно ускоряется и кривая зависимости  $1 - \theta$  от времени имеет S-образную форму.

Если двойная спираль имеет дефекты — исходно деспирализованные участки, начальный наклон кривой увеличивается. Кривая показана на

рис. 7.21. Из теории следует формула

$$-\ln \theta = (ky + 2k'c)t + kk't^2, \quad (7.40)$$

где  $y$  — начальные размеры центра расплетания, выраженные в числе пар;  $c = \bar{n}^{-1}$  — концентрация дефектов,  $\bar{n}$  — среднее число пар в спиральном участке. Зависимость  $-\ln \theta/t$  от  $t$  прямолинейна и прямая отсекает на оси ординат отрезок

$$z = ky + 2k'c. \quad (7.41)$$

Формальдегид является таким раскручивающим агентом. Оценим правую часть формулы (7.41). Из опытов с мононуклеотидами следует, что константа скорости реакции  $k'$  между основанием и формальдегидом имеет порядок  $1 \text{ мин}^{-1}$ . Следовательно,  $k = wk' \sim \sigma k' \sim 10^{-4} - 10^{-5} \text{ мин}^{-1}$ . Значение  $y$  неизвестно, но разумно положить его равным нескольким единицам. Итак,  $ky \sim 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$ . Эта величина лежит ниже предела чувствительности кинетических опытов, ею можно пренебречь по сравнению с  $2k'c$ , так как  $k' \gg k$ , а  $c$  имеет порядок единиц. Таким образом,

$$z = 2k'c. \quad (7.42)$$

Константа  $k'$  находится из опытов с фрагментировавшей ДНК по формуле (7.42) — в этих случаях  $c$  известно. Порядок величины  $k'$  —  $2.5 \text{ мин}^{-1}$ . Наименьшее значение  $z$ , которое может быть измерено, —  $3 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$ .

Иными словами, КФМ позволяет определять минимальную концентрацию дефектов с порядка одного дефекта на  $10^4$  пар нуклеотидов. Метод очень чувствителен. Он с успехом применяется для изучения ДНК с разрывами, вызванными ультрафиолетовым облучением или ферментативным гидролизом и т. д. Нативная ДНК оказывается практически лишенной дефектов, что опровергает зигзагообразную модель с резкими изломами. КФМ применим к изучению комплексов ДНК с РНК-полимеразой и тонкой структуры ДНК.

Денатурированные, клубкообразные одиночные цепи ДНК способны ренатурироваться, вновь образовывать двойную спираль. Ренатурация ДНК была открыта и изучена Мармуром и Доги (1961). При медленном охлаждении, т. е. «отжиге», денатурированной ДНК частично восстанавливаются и биологическая активность (рис. 7.22), и гипохромный эффект. 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 плотности CsCl (см. с. 82, 233). Например, плотность нативной ДНК равна  $1,704 \text{ г/см}^3$ , у денатурированной и закаленной в этом состоянии она составляет  $1,716$ , у ренатурированной —  $1,700 \text{ г/см}^3$ . Ренатурация сильно зависит от температуры; оптимальной для ренатурации является температура, достаточно высокая для разворачивания клубков и вместе с тем достаточно

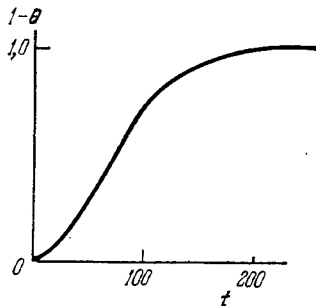


Рис. 7.21. Кинетическая кривая для ДНК с дефектами ( $t$  — в условных единицах)

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 телят, 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.

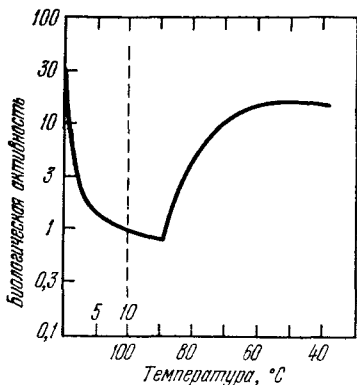
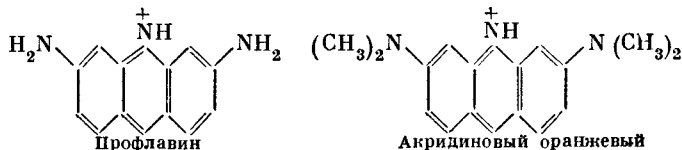


Рис. 7.22. Ренатурация ДНК. Числа над абсциссой 5 и 10 — время выдерживания образца при 100°C

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

### § 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.