

УДК 577.3

## ДИНАМИКА ПЛАЗМИДНЫХ ДНК

П. П. Горяев, С. М. Дзекунов, К. В. Григорьев, В. А. Щеглов

*Методом оптического смешения исследовано влияние размера и конформации макромолекул ДНК на их динамические характеристики. Измерения спектров светорассеяния для растворов плазмидных ДНК показали замедление релаксационных процессов при переходе кольцевых плазмид в линейную конформацию. В то же время для линейной формы плазмиды с меньшей контурной длиной было обнаружено "аномальное" ускорение релаксационных процессов на больших углах измерения, соответствующих внутренним движениям в полимерном клубке. Полученный эффект можно объяснить более слабыми топологическими ограничениями внутри клубка для плазмидной ДНК меньшей длины.*

Измерения светорассеяния проводились в диапазоне углов рассеяния 35 – 120 градусов по гомодинной оптической схеме с использованием He-Ne лазера. Сигнал от фотодатчика с помощью аналого-цифрового преобразователя передавался на ЭВМ для хранения и обработки численными методами. В работе использованы плазмиды pBR-325 и pVZ-361 в кольцевой, замкнутой форме, а также в линейной конформации. Линеаризацию плазмид осуществляли с помощью эндонуклеазы рестрикции BamH1 по стандартной методике. Основные характеристики плазмид приведены в табл. 1.

Кювета с изучаемым образцом устанавливалась в термостатируемый светонепроницаемый бокс, и по общей индикатрисе рассеяния контролировалась правильность установки кюветы и готовность комплекса. Для каждого образца флуктуации интенсивности рассеянного света измерялись при различных углах рассеяния с шагом 3 градуса в указанном выше диапазоне. Для получения спектра с разрешением  $\approx 1\text{Hz}$  эксперименты ставились отдельно для каждого образца и флуктуации интенсивности

набирались на конкретно выбранных углах рассеяния. В пределах одной серии выделения и рестрикции ДНК препараты, соответствующие кольцевой и линейаризованной форме каждой из плазмид (pBR-325 или pVZ-361), анализировались в условиях одного эксперимента. Параметры спектров обрабатывались на ЭВМ. Для каждого из спектров обработка включала в себя следующее: а) аппроксимацию по методу наименьших квадратов экспериментальных значений к кривой лоренцевского вида [1, 2]; б) определение полуширины спектра  $\Gamma$  [3, 4]; в) построение угловой зависимости усредненной полуширины спектра.

Т а б л и ц а 1

## Параметры плазмидной ДНК

Плазида	Размер, тысяча пар нуклеотидов*	Молекулярный вес, $10^6$	Контурная L длина, мкм	Концентрация, мг/мл
pBR-325	6,0	3,9	2,0	0,67
pVZ-361	11,4	7,4	3,88	0,67

\* Мол. вес для одной пары нуклеотидов,  $M=650$  Дальтон. Длина для одной пары,  $l=0,34$  нм.

На рис. 1 представлены полученные угловые зависимости полуширины спектра для каждой из плазмид. Угол наклона усредненной прямой для каждой из зависимостей, определяет в данном случае величину времени релаксации основной динамической моды наблюдаемых флуктуаций светорассеяния. Исходя из соотношений для спектров светорассеяния [4], это время обратно пропорционально углу наклона. Следовательно, сравнивая зависимости для кольцевых плазмид pVZ-361 и pBR-325, мы можем говорить о замедлении релаксационных процессов в случае плазмиды с большей контурной длиной (т.е. pVZ-361). Это замедление мы наблюдаем также при переходе каждой из плазмид в линейную конформацию. Здесь следует отметить, что эффект увеличения времени релаксации при линейаризации плазмид значительно более выражен для макромолекул меньшей длины (т.е. pBR-325). При этом наиболее интересно резкое уменьшение времени релаксации для линейной формы плазмид меньшей длины при измерениях на больших углах (на графике это соответствует излому зависимости для линейной конформации плазмиды pBR-325), которое становится сравнимым с временем релаксации для кольцевой формы макромолекулы. Заметим также, что при измерениях на

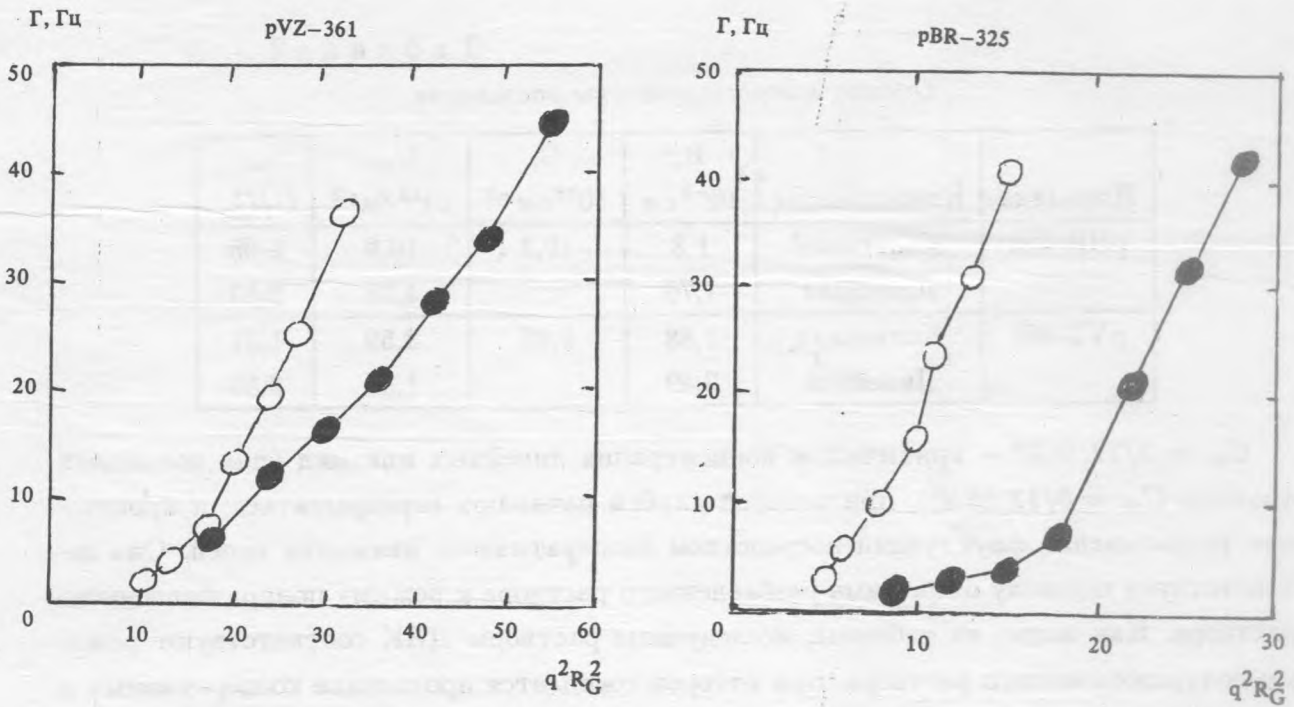


Рис. 1. Зависимость полуширины спектров  $\Gamma$  от угла рассеяния.  $\circ$  – кольцевые плазмиды,  $\bullet$  – линейные плазмиды.

больших углах изучаются внутренние движения в полимерном клубке, т.е. движения, происходящие на масштабах размера клубка  $R$  [4]. Прежде чем перейти к обсуждению полученных результатов, дадим оценку микроструктуры растворов для условий нашего эксперимента. Параметры для этой оценки были взяты из стандартной модели динамических свойств полимерных клубков в растворе (4) и приведены в табл. 2.

В соответствии с [4] радиус инерции  $R$  для линейных плазмид определяется по формуле:

$$R^2 = p^2 [L/3p - 1 + 2p/L - \{1 - \exp(-L/p)\} / (L/p)^2], \quad (1)$$

где персистентная длина  $p = 50$  нм, значения контурной длины  $L$  брались из табл.

1. В случае кольцевых плазмид радиус инерции  $R_*$  рассчитывался по той же формуле (1) с исходными данными:  $L_* = L/2$ ,  $p_* = 60$  нм [4]. Полученные значения  $R_*$  хорошо согласуются с величиной  $R_* = R/1,4142$ , рекомендуемой в литературе для замкнутых кольцевых ДНК ( $R$  – радиус инерции для линейной формы ДНК).

Т а б л и ц а 2

## Оценка микроструктуры растворов

Плазида	Конформация	$R$ , $10^{-5}$ см	$C$ , $10^{13}$ см $^{-3}$	$C_{cr}$ , $10^{13}$ см $^{-3}$	$C/C_{cr}$
pBR-325	Кольцевая	1,3	10,3	10,9	0,95
	Линейная	1,76		4,38	2,53
pVZ-361	Кольцевая	1,88	5,43	3,59	1,51
	Линейная	2,49		1,55	3,50

$C_{cr} = 3/12,56R^3$  – критическая концентрация линейных плазмид (для кольцевых плазмид  $C_{cr} = 3/12,56R_*^3$ ), при которой клубки начинают перекрываться, и происходит рассасывание флуктуаций посредством кооперативного движения цепей. Она соответствует переходу от режима разбавленного раствора к режиму полуразбавленного раствора. Как видно из таблицы, исследуемые растворы ДНК соответствуют режиму полуразбавленного раствора, при котором ожидается проявление кооперативных и других "аномальных" эффектов [5].

Таким образом, анализируя полученные результаты и приведенные для них оценки, можно предположить, что для суперспирализованных молекул увеличение радиуса инерции ведет к замедлению движения клубков как целого. Однако, как уже было сказано, указанные растворы относятся к полуразбавленным, для которых понятие радиуса инерции (гидродинамического радиуса) несколько теряет свой смысл. Это обстоятельство, возможно, и определяет различие динамических эффектов при переходе кольцевых плазмид в линейную конформацию. Так для линейаризованных плазмид pVZ-361 существенный вклад в светорассеяние могут давать флуктуации, динамика которых определяется согласованными движениями многих полимерных цепей, что значительно уменьшает время релаксации (полимерный раствор становится более "упругой" средой) [4]. В то же время, незамкнутые молекулы плазмиды pBR-325 могут при данной концентрации моделироваться перекрывающимися клубками, для которых еще выполнимы соотношения разбавленных растворов. Такие различия обуславливает большее значение  $C/C_{cr}$  для плазмиды pVZ-361, которое, в свою очередь, вызвано большей контурной

длиной. И, наконец, характерный "излом" на графике для линейной формы плазмиды рBR-325 можно объяснить более слабыми топологическими ограничениями на взаимопересечение цепей, проявляющимися на малых масштабах, которые соответствуют внутренним движениям в клубке (большие углы измерения). Топологические запреты делают полимерный раствор "длинных" молекул (рVZ-361) более "вязким" на этих масштабах. В целом полученные результаты и указанные предположения хорошо согласуются с качественными представлениями динамической модели Роуза. С другой стороны, совершенно очевидна важность учета топологических ограничений при увеличении контурной длины маромолекулы, который отсутствует в данной модели. Этот вопрос описывает в литературе модель рептации [4].

В заключение следует обратить внимание на неравнозначность двух альтернативных способов перехода от разбавленного раствора к полуразбавленному, предложенных ранее в работе [5]. Это происходит или за счет изменения концентрации при постоянной длине фрагментов ДНК, или за счет изменения длины фрагмента при постоянной концентрации. Как показывает опыт, при различных способах такие фундаментальные свойства полимерных растворов как вязкость и упругость могут проявлять себя по-разному в зависимости от величины масштаба, на котором рассматриваются движения полимерных цепей в растворе.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] И в а н о в а М. А., Л о м а к и н А. В., Н о с к и н В. А. Молекулярная биология, 17, 653 (1983).
- [2] Л о м а к и н А. В., Н о с к и н В. А. Препринт ЛИЯФ АН N 509, Ленинград, 1979.
- [3] Э с к и н В. Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул, М., Наука, 1986.
- [4] Г р о с б е р г А. Ю., Х о х л о в А. Р. Статистическая физика макромолекул, М., Наука, 1989.
- [5] Г а р я е в П. П. и др. Краткие сообщения по физике ФИАН, N11-12, 63 (1992).

Поступила в редакцию 20 октября 1993 г.