Краткие сообщения по физике № 11, 12 — 1992 г.

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУКТУАЦИОННОЙ ДИНАМИКИ РАСТВОРОВ ДНК МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

П. П. Гаряев, К. В. Григорьев, А. А. Васильев,
В. П. Попонин, В. А. Щеглов

Впервые в полуразбавленных растворах фрагментов ДНК средней длины 25000 пар оснований и с концентрацией более 1 мг/мл методом спектроскопии корреляции фотонов обнаружены слабозатухающие, квазипериодические колебания длинноволновых флуктуаций плотности, которые могут быть объяснены образованием микроструктуры типа мягкий гель.

Интерес к исследованию флуктуационной динамики ДНК в растворе методами лазерной корреляционной спектроскопии обусловлен, с одной стороны, желанием изучить поведение ДНК в условиях, близких к условиям ее функционирования в живой клетке с целью понять ее биологическую функцию /1, 2/, а, с другой стороны, перспективностью ДНК как модельной макромолекулы для изучения общих закономерностей физики полимеров в растворе /3/. До настоящего времени основное внимание уделялось исследованию сильно разбавленных растворов ДНК. В частности, в цикле работ группы Пекоры /4 — 6/ проведено систематическое исследование флуктуационной динамики сильно разбавленных растворов фрагментов ДНК строго определенной длины методом спектроскопии корреляции фотонов. К сожалению, методы получения рестриктивных фрагментов ДНК строго определенной длины, развитые модекулярными биологами, пока еще не позволяют получать их в достаточном количестве, необходимом для изучения конформационной динамики полуразбавленных и концентрированных растворов. По этой причине более концентрированные растворы ДНК изучены значительно хуже. Между тем, для понимания механизмов функционирования живого на молекулярном уровне наибольший интерес представляет поведение ДНК в растворе при высоких концентрациях.

Целью настоящей работы было изучение флуктуационной динамики разбавленных и полуразбавленных растворов ДНК методом лазерной корреляционной спектроскопии. Особое внимание уделялось исследованию эффектов, возникающих при переходе от разбавленного раствора к полуразбавленному. В качестве объектов исследования были выбраны образцы растворов двух существенно различающихся по длине фрагментов ДНК: длинных — со средней длиной 25000 пар оснований и коротких — со средней длиной 400 пар оснований. В качестве исходного вещества использовался препарат ДНК из эритроцитов цыплят производства фирмы Reanal. Короткие

фрагменты ДНК получены стандартным методом ультразвуковой обработки исходного препарата. По данным гель электрофореза как длинные, так и короткие фрагменты ДНК обладали некоторой полидисперсностью, а их количество было достаточным для получения растворов более высоких концентраций, чем разбавленные. В качестве растворителя использовался стандартный солевой раствор SSC (0,1M Na-цитрат, 1,51M NaCl, 10mM EDTA, pH = 7,0). Использовались два типа кювет: стеклянные цилиндрические диаметром 6 мм и пластмассовые прямоугольные сечением 12 × 12 мм^2. Эксперименты выполнялись на измерительном комплексе для спектроскопии корреляции фотонов MALVERN 4700, включающем в себя спектрометр рассеянного света с переменным углом PCS 100, источник когерентного излучения — He-Ne лазер с мощностью излучения 25 мВт и длиной волны излучения λ_0 = 632,8 нм, а также 128-канальный 8-разрядный коррелятор, подключенный к компьютеру IBM PC/AT. Измерения проводились в режиме двух времен дискретизации: τ = 2000 мкс/канал и τ = 10000 мкс/канал. Измерительная система надежно регистрировала флуктуации плотности раствора в диапазоне частот 1 — 500 Гц и пространственных масштабов $L \gtrsim 100$ нм. Последнее условие получено из ограничения, накладываемого длиной волны зондирующего излучения λ_0 и углом рассеяния θ : $L \gtrsim 1/q$, $q = (4\pi n/\lambda_0)\sin(\theta/2)$, где n — показатель преломления раствора.

До начала эксперимента были проведены оценки ожидаемых параметров микроструктуры приготовленных растворов ДНК. Поскольку использованный в экспериментах растворитель близок к нейтральному (Θ — раствор), то было принято предположение, что в таком растворе макромолекула (в данном случае фрагмент ДНК определенной длины) имеет конформацию гауссового клубка. Для оценки характерного размера клубка использовался средний радиус инерции R_g, который в рамках персистентной модели полимерной цепи определяется формулой /7/:

$$(R_g/l)^2 = (x/3)\,[1 - 3/x + 6/x^2 - (6/x^3)(1 - e^{-x})], \qquad (1)$$

где $x = L/l$, l — персистентная длина, $L = aN$ — контурная длина макромолекулы, a — длина мономера, N — полное число мономеров в цепной молекуле.

Критическое значение концентрации полимера в растворе C_{cr}, начиная с которого клубки начинают перекрываться, определяется формулой:

$$C_{cr} = 3ml^2/4\pi aLR_g^3, \qquad (2)$$

где m — масса мономера (в случае ДНК мономером является пара оснований). При численных

оценках использовались следующие значения параметров: $l = 50$ нм, a = 0,34 нм, m = 660 D.

Переход от разбавленного раствора к полуразбавленному осуществлялся двумя различными способами. Во-первых, за счет изменения концентрации ДНК в растворе C при постоянной длине фрагмента ДНК, во-вторых, за счет изменения длины фрагмента при постоянной концентрации ДНК в растворе. Оценки по формуле (2) для фрагментов ДНК, использованных в работе, дают следующие значения критической концентрации: C_{cr} = 0,12 мг/мл — для длинных фрагментов ДНК, и 3,5 мг/мл — для коротких фрагментов ДНК.

В случае растворов длинных фрагментов ДНК измерения временных автокорреляционных функций (АКФ) интенсивности рассеянного излучения выполнены для набора концентраций (0,1, 0,56, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 8,0 мг/мл) при температурах раствора 25 и 60 °C и при значениях угла рассеяния 35 и 70°. В случае раствора из коротких фрагментов ДНК измерения проведены для одного значения концентрации 4 мг/мл. Для растворов из длинных фрагментов ДНК при концентрациях от 1 мг/мл и выше обнаружены слабозатухающие квазипериодические колебания на частотах вблизи 8, 11, 16, 27 и 32 Гц в случае прямоугольной кюветы, и вблизи 100 Гц в случае цилиндрической кюветы. При наблюдении АКФ в последовательные моменты времени с интервалом 30 — 40 с обнаружены сменяющие друг друга картины, свидетельствующие о сложной динамике флуктуаций плотности в растворе. В случае раствора коротких фрагментов ДНК при концентрации 4 мг/мл квазипериодические режимы не обнаружены. Кроме того установлено, что вид АКФ не изменяется при изменении угла рассеяния, что свидетельствует о том, что регистрируются длинноволновые флуктуации плотности с масштабом большим, чем характерный размер клубков. Также обнаружена высокая чувствительность динамических картин к слабым внешним возмущениям и к условиям приготовления образцов растворов.

На рис. 1 представлены фурье-спектры временных АКФ лазерного излучения рассеянного на растворах длинных фрагментов ДНК при различных значениях концентрации. Начиная с концентрации 2 мг/мл, появляется слабозатухающее квазигармоническое колебание на частоте вблизи 16 Гц, которое присутствует и при более высоких концентрациях вплоть до 8 мг/мл.

На рис. 2 представлены фурье-спектры АКФ, измеренные в последовательные моменты времени с интервалом 30 — 40 с для случаев длинных фрагментов ДНК (А) и коротких фрагментов ДНК (Б) при одном и том же значении концентрации 4 мг/мл. В первом случае слабозатухающее квазигармоническое колебание присутствует на протяжении всего времени наблюдения, причем при переходе от одного кадра к другому частота колебания изменяется с 11 на 16 Гц, тогда как во втором случае квазигармонические колебания отсутствуют.

На рис. 3 показаны аналогичные, измеренные последовательно с интервалом 30 — 40 с

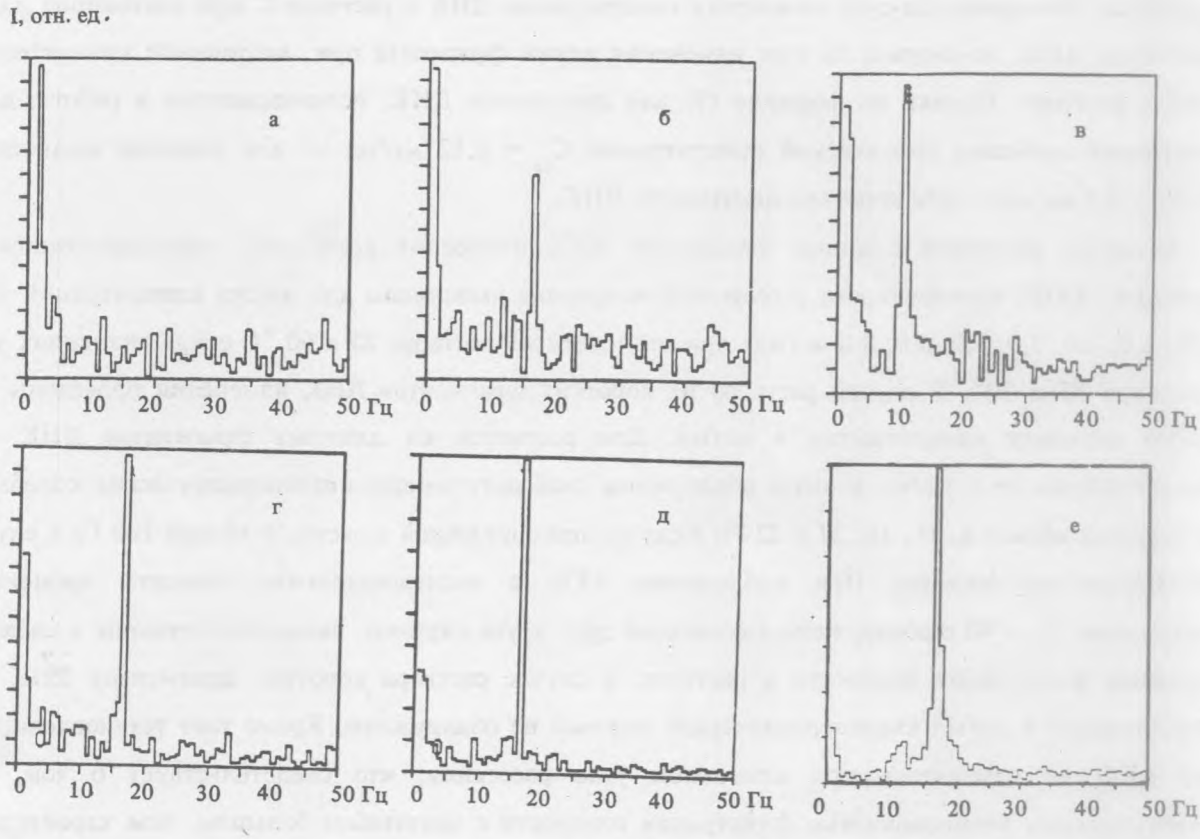

Рис. 1. Фурье-спектры АКФ излучения, рассеянного на растворах длинных фрагментов ДНК при различных значениях концентрации приблизительно через 1 час после заполнения кювет раствором. Параметры измерения: $\theta = 70^\circ$, $T = 25\ ^\circ C$, $\tau = 10000$ мкс/канал, размеры кюветы: 12×12 мм^2, высота заполнения $h = 8$ мм; $C = 1$ мг/мл (а), 2(б), 3(в), 4(г), 5(д), 8(е).

фурье-спектры АКФ, для двух различных значений температуры 25 и 60 °С. Видно, что при повышении температуры квазигармонические колебания не исчезают, а происходит смена динамических картин, в частности, появляются квази-бигармонические колебания с частотами 11 и 16 Гц.

Таким образом, результаты эксперимента показывают, что при переходе от разбавленного раствора к полуразбавленному в результате повышения концентрации слабозатухающие колебания плотности появляются только в области существенно полуразбавленного раствора при концентрациях ДНК в растворе, по крайней мере, на порядок превосходящих критическую. Слабозатухающие колебания также исчезают по мере перехода от полуразбавленного к

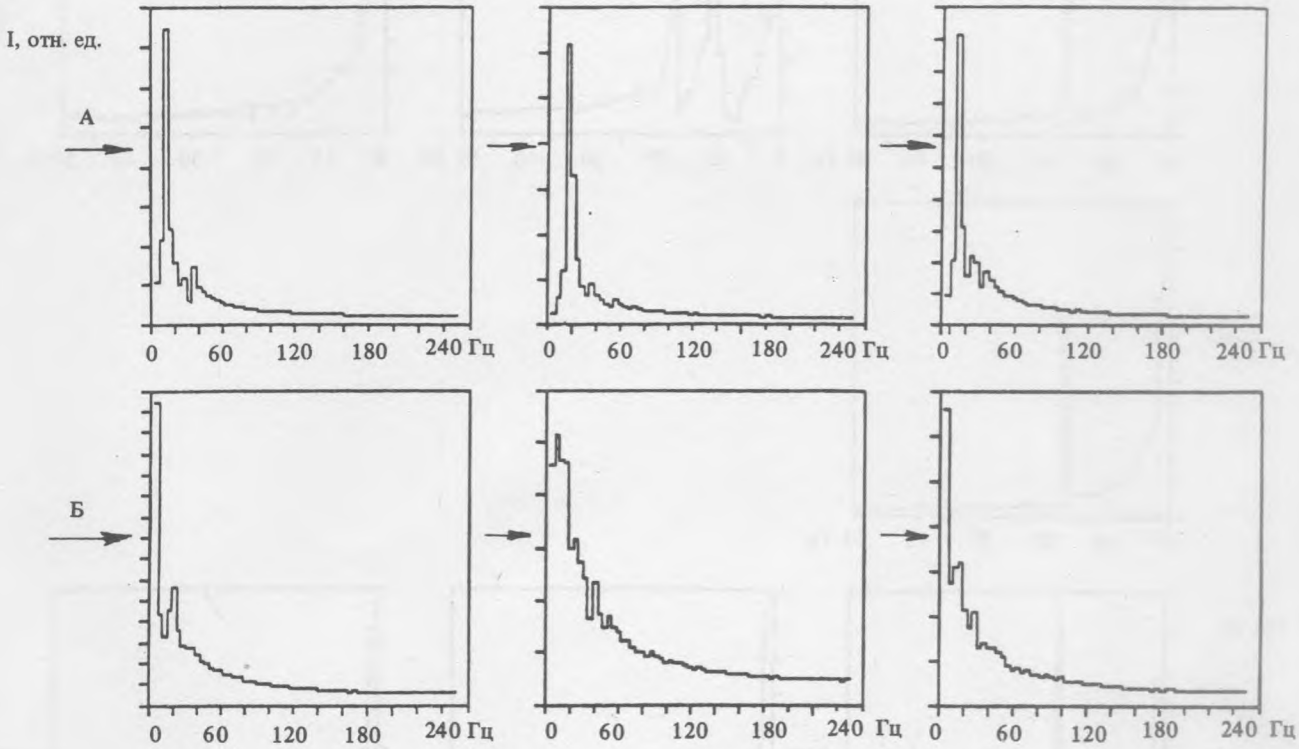

Рис. 2. Фурье-спектры АКФ излучения рассеянного на растворах ДНК, измеренные последовательно с интервалом 30 — 40 с: А — раствор, содержащий длинные фрагменты ДНК со средней длиной 25000 пар оснований; Б — раствор, содержащий короткие фрагменты ДНК со средней длиной 400 пар оснований; Параметры измерения: θ = 35, T = 25 °C, τ = 2000 мкс/канал, C = 4 мг/мл.

разбавленному раствору в результате уменьшения длины фрагмента. Эти данные подтверждают предположение о том, что явления типа самоорганизации можно ожидать только при таких физических условиях, когда существенную роль играют кооперативные эффекты. Возможность существования слабозатухающих колебаний возмущений плотности в случае раствора длинных фрагментов ДНК качественно можно объяснить следующим образом. Вследствие достаточно больших значений радиуса инерции клубков длинных фрагментов ДНК в изученном диапазоне концентраций реализуется режим существенно полуразбавленного раствора, когда клубки могут взаимно перекрываться и перепутываться. При этом макроскопические упругие свойства раствора определяются коллективными взаимодействиями и возможностью образования структуры мягкого геля. В случае раствора из коротких фрагментов ДНК вследствие малости радиуса инерции

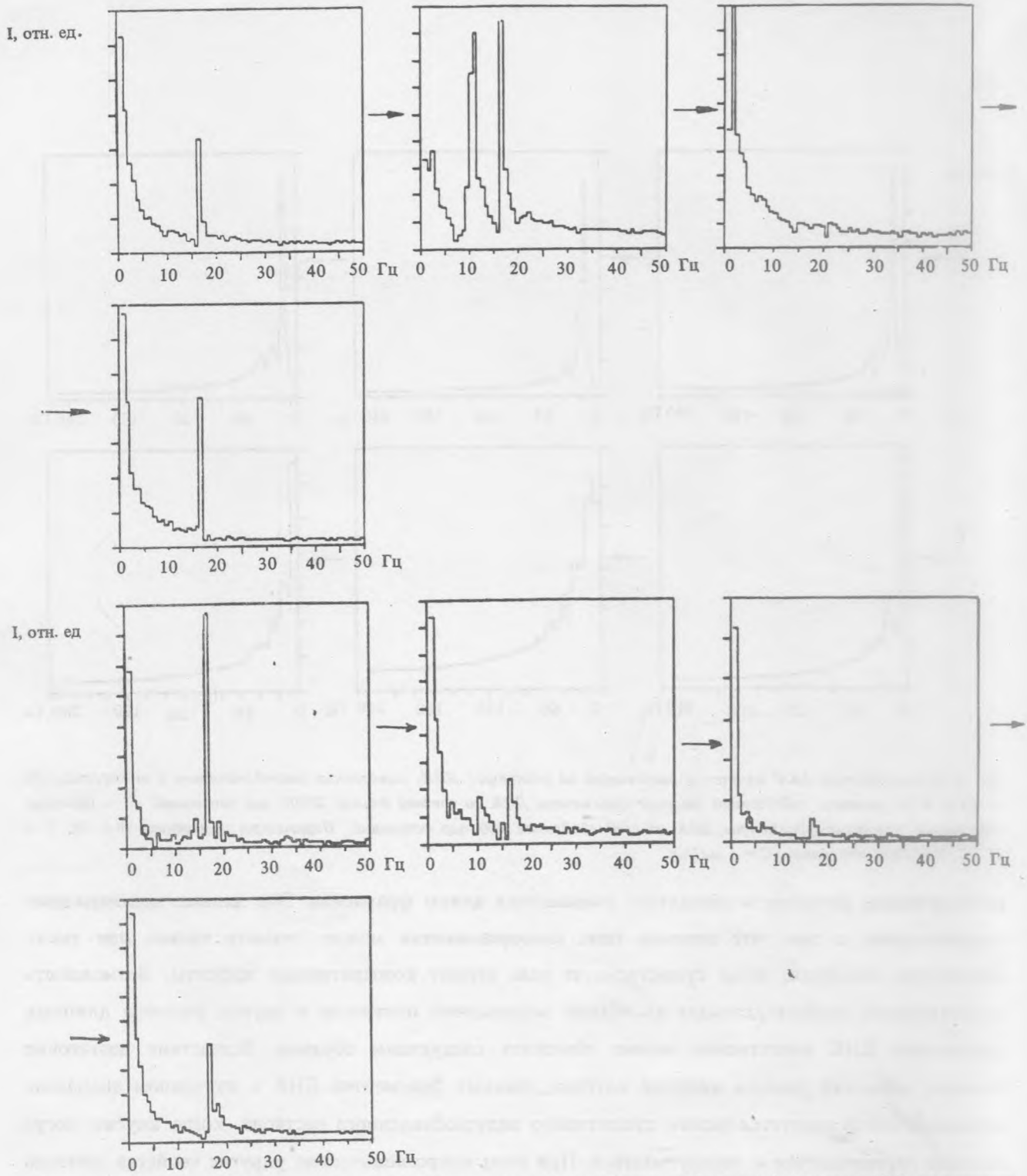

Рис. 3. Фурье-спектры АКФ излучения рассеянного на растворах, содержащих длинные фрагменты ДНК, измеренные последовательно с интервалом 30 — 40 с. Параметры измерения: θ = 70, T = 25 °C (А) и 60 °C (Б), τ = 10000 мкс/канал, C = 5 мг/мл.

указанных фрагментов в том же диапазоне концентраций реализуется режим разбавленного раствора, когда среднее расстояние между макромолекулами в растворе велико и коллективные взаимодействия несущественны.

Несколько неожиданным является обнаружение упругих свойств полуразбавленных растворов из длинных фрагментов ДНК в диапазоне частот 1 — 100 Гц. В работе /8/ аналогичное поведение обнаружено при исследовании агарозного геля методом квазиупругого рассеяния лазерного излучения. Этими же авторами было предложено использовать динамическое рассеяние света для определения упругих характеристик (коэффициентов упругости) мягких гелей различной природы. В частности, было показано, что этот метод эффективен в диапазоне коэффициентов упругости 10^2 — 10^5 Дин/см^2. Если провести оценки по методике Бреннера — Гелмана — Ноззала для условий описанных экспериментов, то для коэффициента упругого сжатия (модуля Юнга) полуразбавленного раствора длинных фрагментов ДНК получаем значение 100 Дин/см^2. Таким образом, в случае длинных фрагментов ДНК, которые являются линейными полимерами (в отличие от агарозы, которая представляет собой сильно разветвленную полимерную молекулу с ярко выраженной тенденцией к образованию микроструктуры геля) при концентрациях, отвечающих микроструктуре полуразбавленного раствора, разумно предположить, что упругость возникает по причине значительного перепутывания клубков с возникновением дальних корреляций по типу мягкого геля. При этом, можно предположить, что сшивки между цепями различных молекул осуществляются либо слабыми водородными связями, либо в результате образования комплексов с ионами.

При построении молекулярных моделей, а также при попытках построения количественных динамических теорий полуразбавленных растворов необходимо учитывать свойства ДНК, как полиэлектролита. В частности, при низкой ионной силе растворителя кулоновские силы могут играть заметную роль в возникновении упругости, приводя к возникновению дальнего порядка по типу структуры коллоидного кристалла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев А. Д. и др. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии, Киев, Наукова думка, 1987.
2. Bloomfield V. A. In: Dynamic Light Scattering, ed. R. Pecora, Plenum Press, New York, 1985, p. 363.
3. Pecora R. Science, **251**, 893 (1991).
4. Sorlie S. S., Pecora R. Macromolecules, **21**, 1437 (1988).
5. Sorlie S. S., Pecora R. Macromolecules, **23**, 487 (1990).
6. Allison S. A., Sorlie S. S. Pecora R. Macromolecules, **23**, 1110 (1990).
7. Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Статистическая физика макромолекул, М., Наука, 1987.
8. Brenner S. L., Gelman R. A., Nossal R. Macromolecules, **11**, 202 (1978).

Поступила в редакцию 10 декабря 1992 г.