

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

А.И. Гасан, В.Я. Малеев, А.В. Филипский.

Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, г. Харьков, 61085, ул. Акад. Проскуры, 12.
Поступила в редакцию 19 сентября 2002 г.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии проведены исследования термической стабильности природной ДНК и четырех типов полинуклеотидов: polyA, polyG, polyC, polyU. Получены термограммы исследуемых веществ в интервале температур от 20 до 300°C. Для всех образцов на экспериментальных кривых обнаружены специфические особенности в виде острых экзотермических пиков. Для ДНК во влажном состоянии (содержание воды выше 5%) обнаружен также эндотермический пик в области 100°C. Высокотемпературные экзотермические пики (в области 250°C для полинуклеотидов и 160°C для ДНК) связываются с необратимыми процессами термической деструкции первичной структуры полимеров. Появление эндотермического пика для образца ДНК обусловлено процессом плавления вторичной структуры ДНК, которая формируется при определенной влажности. Для всех образцов определены температуры и температурные интервалы процесса деструкции, а также рассчитаны значения эффективной теплоты термического разрушения и его эффективной энергии активации. Экспериментальные результаты свидетельствуют о существенном различии термической устойчивости первичной структуры разных гомогенных полинуклеотидов и ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полинуклеотиды, ДНК, термическое разрушение, калориметрия.

Тепловые методы исследований, в частности дифференциальная сканирующая микрокалориметрия (ДСК), неоднократно применялись для изучения термоустойчивости биологических объектов различного уровня сложности [1,2]. Применительно к белкам и нуклеиновым кислотам методами ДТА и ДСК были получены индивидуальные термограммы многих образцов и исследованы различные процессы, происходящие с ними при нагревании [3,4]. Однако, проведенный анализ имеющихся данных показал, что исследованию термической стабильности первичной структуры нуклеиновых кислот уделено недостаточно внимания (и связано это было со значительной массой образца, необходимого для проведения измерений). Вместе с тем очевидна важность подобных исследований, поскольку именно устойчивость первичной структуры ДНК является определяющей при ее функционировании.

Известно, что природная ДНК по своему составу является гетерогенной структурой и, естественно, возникает предположение о возможной зависимости энергетических параметров, характеризующих термоустойчивость первичной структуры полимера от нуклеотидного состава. Для определения этой зависимости проведены калориметрические исследования термической устойчивости первичной структуры природной ДНК и ряда гомополинуклеотидов.

Если термостабильность полинуклеотида является специфичной, то подобные исследования могут использоваться как для идентификации, так и определения «чистоты» исследуемых нуклеиновых кислот путем сравнения с данными калориметрического анализа для известной ДНК.

Понятие термической устойчивости, введенное авторами работы [5] обозначает температуру, с которой начинается изменение химической структуры вещества, отражающееся на его физико-химических свойствах. Под этим изменением мы принимали термическое разложение полимера. Известно, что разрушение любой структуры сопровождается затратой энергии, необходимой для разрыва связей. Однако общий тепловой эффект процесса может быть экзотермическим, если сразу после разрыва происходит перестройка свободных групп, сопровождающаяся выделением тепла, что хорошо видно на примере диссоциации взрывчатых веществ.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Метод ДСК позволяет регистрировать изменения, происходящие в исследуемом образце при нагревании, сопровождающиеся поглощением или выделением тепла, соответственно, в форме эндо- или экзотермических пиков, независимо от агрегатного состояния.

Измерения проводили с помощью дифференциального сканирующего калориметра DSC-101 фирмы "Сетарам" в двух герметично закрытых кюветках, одна из которых служила кюветкой сравнения.

Эксперименты проводили со скоростями сканирования 1 и 5 °С/мин. Калибровку прибора осуществляли с помощью стандартных образцов индия и олова, имеющих различные энергии и температуры плавления, а также дифенила.

Для повышения надежности расчетов, проведенных по кривым ДСК, эксперимент с каждым образцом проводили не менее двух раз.

Исследовали твердые образцы гомополинуклеотидов polyA, polyG, polyC, polyU фирмы "Serva", а также образец натриевой соли тимусной ДНК, полученной в Институте биоорганической химии АН Беларуси, г. Минск (относительная молекулярная масса ДНК в среднем составляла 10^7 Да, величина гиперхромного эффекта 38-39% при $\lambda=260$ нм).

Для выяснения роли воды, связанной с ДНК, готовили образцы с определенной влажностью по следующей методике. С помощью растворов насыщенных солей в герметично закрытой камере задавали относительную влажность и выдерживали предварительно высушенные образцы ДНК в течение 48 часов, что являлось достаточным условием для достижения равновесия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные экспериментальные результаты представлены в виде термограмм на рисунках 1-3. Кривые нормированы на массу исследуемого образца с использованием РС.

Как видно из рисунка 1, исследуемые полинуклеотидные структуры имеют строго индивидуальные особенности, проявляемые на термограммах в виде острых экзотермических пиков в интервале температур от 240 до 290 $^{\circ}$ С, и отличающихся по температуре более чем на 50 $^{\circ}$ С.

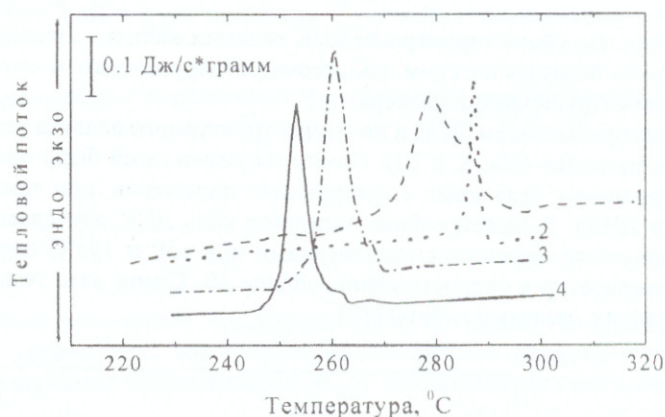


Рис. 1 Термограммы полинуклеотидов. Скорость нагрева 1 $^{\circ}$ С/мин.
1 - polyU, 2 - polyG, 3 - polyC, 4 - polyA.

Из рисунков 1 и 2 видно, что увеличение скорости нагрева в 5 раз для гомогенных полинуклеотидов приводит к увеличению ширины пиков и смещению их максимумов в сторону более высоких температур. Для всех полинуклеотидов (кроме polyG) при сканировании со скоростью 1 $^{\circ}$ С/мин после основного экзотермического пика наблюдается еще один небольшой экзопик, наиболее сильно выраженный в случае polyU. При большей скорости нагрева этот пик уже не проявлялся. Наблюдаемый эффект, вероятно, связан со скоростью процесса, связанного с первым пиком [6]. То есть, более медленный процесс при быстром нагревании смещается в область более высоких температур и накладывается на второй пик.

Термоустойчивость полимеров определяли по температуре максимума пика на экспериментальных кривых, соответствующего наибольшей скорости процесса. Это не совсем корректно, т. к. процессы разрушения начинаются раньше (чему соответствует начало отклонения экспериментальной кривой от базовой линии). Однако, указать точно температуру начала процесса по экспериментальным кривым затруднительно. Так как температура максимума пика зависит от скорости нагрева и растет с увеличением скорости сканирования, то для исключения, этого методического фактора, температуру перехода $T_{\text{макс}}$ мы определяли путем аппроксимации к нулевой скорости нагрева [7,8].

Из экспериментальных результатов (табл.1, строка 2) видны существенные отличия температур деструкции исследуемых полинуклеотидов, что указывает на энергетические отличия связей, участвующих в процессе разрушения полимера.

Из полученных данных видно, что структура polyG является наиболее термоустойчивой.

На рисунке 3 представлены термограммы ДСК твердых образцов натриевой соли ДНК с различным содержанием воды (5% и 30%). Видно, что полученные кривые отличаются между собой наличием эндотермического пика при температуре около 80 $^{\circ}$ С у более влажного образца. Этот пик соответствует процессу плавления ДНК, что неоднократно было подтверждено как калориметрическими исследованиями, так и другими методами [9].

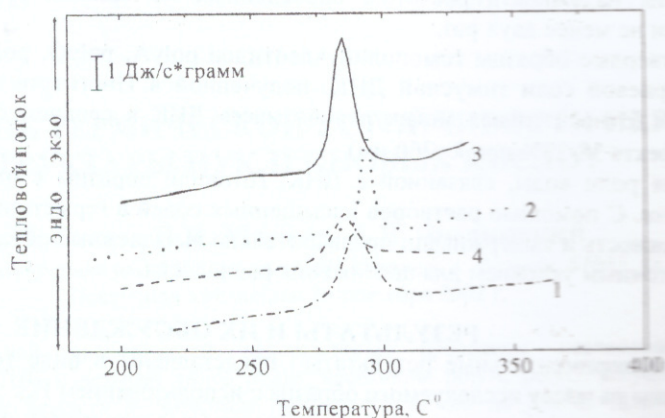


Рис. 2 Термограммы полинуклеотидов. Скорость нагрева $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.
1 - polyU, 2 - polyG, 3 - polyC, 4 - polyA.

Другой особенностью обеих термограмм ДНК является наличие экзотермического пика около 165°C , который соответствует экзотермическим процессам, обнаруженным в случае гомополинуклеотидов, и связан с термическим разрушением полимера.

В работе [10] авторы методом ДСК и рентгеноструктурного анализа исследовали связывание воды с солью ДНК разных металлов (Na, K и Cs). Одним из результатов было обнаружение для всех образцов экзотермических процессов, связанных с деструкцией полимеров, при температуре около 240°C (230°C для натриевой соли ДНК). В нашей работе натриевая соль ДНК изучалась при скорости нагрева 1 и $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, и были получены экзопики с максимумами при 159 и 195°C соответственно. Аппроксимация данных значений температур к скорости сканирования $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ дала температуру максимума $\sim 234^{\circ}\text{C}$, что хорошо согласуется с данными работы [10].

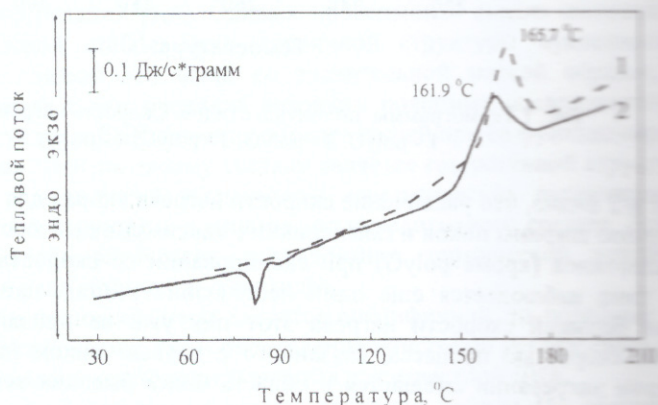


Рис. 3 Термограммы Na- ДНК с различным содержанием воды. 1-5%, 2-30%.

На основе экспериментальных данных для всех исследуемых образцов были рассчитана эффективная теплота процесса термического разрушения ($\Delta H_{\text{эфф}}$). Данный параметр является общим для всего процесса, который может быть суммой более простых реакций.

Тепловой эффект рассчитывали по площади, ограниченной экспериментальной кривой и базовой линией.

По результатам расчета $\Delta H_{\text{эфф}}$ для гомополинуклеотидов (табл.1, строка 3) видно, что процесс деструкции сопровождается различным изменением энергии системы. Наименьшее значение $\Delta H_{\text{эфф}}$ наблюдается для polyG и свидетельствует о наименьшей энергетической выгоде процесса разрушения данной структуры. Видно, что разрушение полимеров с пуриновыми основаниями сопровождается выделением меньшей теплоты, чем у цепей, содержащих пиримидиновые основания.

Значения $\Delta H_{\text{эфф}}$ для ДНК (табл. 1, строка 2) мало отличаются от усредненного значения $\Delta H_{\text{эфф}}$ однородных полинуклеотидов, которое равно $54,74$ кДж/моль, что указывает на независимость теплового эффекта процесса разрушения первичной структуры ДНК от ее нуклеотидного состава.

Термическое разрушение полинуклеотидов, как и большинства линейных полимеров, описывается известным уравнением, применимым для необратимых процессов [11]:

$$\frac{\partial \alpha}{\partial t} = A(1 - \alpha)^n e^{-\frac{E_a}{RT}},$$

где α - доля прореагировавшего вещества, n - порядок реакции, E_a - энергия активации. Для расчета E_a в работе использовали метод Киссинджера [12], применимый для необратимых температурно-активируемых процессов. Для расчетов необходимо, чтобы была известна скорость нагрева, которая должна быть постоянна во времени. Смещение T_{\max} экзо- или эндотермического пика на экспериментальной кривой при изменении скорости сканирования, наблюдаемое в наших опытах, и является показателем температурной активируемости процесса, что позволяет вычислить энергию активации. Предполагается, что максимум пика примерно соответствует максимальной скорости процесса и $n=1$. Тогда дифференцируя дважды уравнение для скорости реакции, записанное в виде:

$$\frac{\partial \alpha}{\partial T} = \frac{A}{\beta} (1 - \alpha)^n e^{-\frac{E_a}{RT}},$$

где β - скорость нагрева ($T = T_0 + \beta t$, $dT = \beta dt$), и, принимая $\frac{\partial^2 \alpha}{\partial T^2} = 0$, Киссинджер получил уравнение

$$\frac{E}{RT^2}_{\max} = \frac{A}{\beta} e^{-\frac{E_a}{RT}}, \text{ откуда следует выражение для определения энергии активации:}$$

$$-E_a = \frac{R * \ln \left(\frac{\beta_1}{\beta_2} * \left(\frac{T_1}{T_2} \right)^2 \right)}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}},$$

где T_1 и T_2 - температуры, соответствующие максимумам пиков при разных скоростях нагрева.

Наблюдаемый процесс может быть комплексом более простых реакций и поэтому, полученные значения энергии активации являются эффективными ($E_{\text{эфф}}$), отражающими суммарный процесс.

Табл. 1 Энергетические характеристики процесса термического разрушения полинуклеотидов.

Образец / Параметр	polyA	polyG	polyC	polyU	ДНК (с.в.30%)	ДНК (с.в.5%)
T_{\max} разр., °C	245.7	284.7	255.0	276.2	158.9	161.5
$\Delta H_{\text{эфф}}$, кДж/моль	52.0	22.8	70.3	74.0	64.5	54.6
$E_{\text{эфф}}$, кДж/моль	125.7	464.1	167.3	336.7	77.2	
Кооперативность, N	2.8	9.2	1.5	1.1	1.6	1.6

Приведенные в таблице 1 (строка 4) значения эффективной энергии активации для процесса термического разрушения первичной структуры нуклеиновых кислот свидетельствуют о существенных различиях величины энергетического барьера, что еще раз указывает на зависимость термической устойчивости от различного химического состава. Видно, что среди гомополимеров структуры polyU и polyG значительно превышают по величине $E_{\text{эфф}}$ структуры polyA и polyC.

Важным моментом является соответствие последовательности увеличения полученных T_{\max} для всех полинуклеотидов с рядом увеличения рассчитанных для них $E_{\text{эфф}}$, что подтверждает сделанные выводы о наиболее и наименее термически устойчивых полинуклеотидах.

Все полученные величины $E_{\text{эфф}}$ для полинуклеотидов, превышают 120 кДж/моль, но $E_{\text{эфф}}$ для образца ДНК имеет значение 77.2 кДж/моль, указывая на значительно меньшую температурную устойчивость природного полимера. Естественно предположить, что механизм разрушения ДНК тот же что и у однородных полинуклеотидов, так как повторяющимися единицами в обоих случаях являются нуклеотиды, с той разницей, что структура ДНК неоднородна. Из этого следует, что в однородных структурах возможным элементарным кинетическим актом является разрушение одновременно нескольких мономеров, т. е. присутствует кооперативность наблюдаемого процесса. При исследовании

процессов стеклования полимеров [13, 14], а также плавления полиэтиленов [15, 16], авторы данных работ указывают, что во многих случаях большие значения энергии активации наблюдаемого процесса обуславливаются кооперативным его характером.

Для определения кооперативного характера процесса в нашем случае, мы применили формулу расчета данного параметра (число мономеров, одновременно участвующих в разрушении), используемого авторами указанных работ:

$$N = \frac{2R \times (T_{\max})^2}{\Delta H \times \Delta T},$$

где T_{\max} – температура, определяемая по максимуму пика, ΔT – температурный интервал, ΔH – теплота перехода, R – универсальная газовая постоянная.

Температурный интервал процесса определяли как разницу соответствующих началу и концу пика температур, каждую из которых определяли методом аппроксимации.

Рассчитанные нами значения N (табл. 1, строка 5) действительно подтверждают наличие кооперативности процесса разрушения для polyG и polyA, а также то, что у природной ДНК как неоднородной структуры кооперативность практически отсутствует ($N \sim 1$).

Близкое к единице значение N в случае polyU скорее всего связано с тем, что для расчета использовали величины ΔT и ΔH общие для всего пика, в то время как видно, что проследит наложение двух пиков, которые необходимо разделять для проведения расчетов. Кроме того, брали T_{\max} для первого пика, что также вносит вклад в уменьшение значения N .

Сравнение величин T_{\max} и $\Delta H_{\text{эф}}$ для образцов ДНК с различной влажностью показывает, что вода влияет на термическую устойчивость природного полинуклеотида: большее ее присутствие снижает температуру разрушения и делает энергетически менее выгодным процесс термического разрушения полимера.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований экспериментально получены термограммы для четырех типов гомополинуклеотидов и природной ДНК, на которых обнаружены индивидуальные особенности структурных изменений, связанных с деструкцией полимеров.

На основе полученных термограмм сделана оценка термической устойчивости исследуемых образцов и проведен расчет параметров, характеризующих процесс термического разрушения полимеров. Вычисленные значения энергетических параметров, характеризующих процесс деструкции, свидетельствуют о различной термостабильности полинуклеотидов и ДНК.

По значениям температур получена следующая последовательность убывания термической устойчивости исследуемых полинуклеотидов: polyG (284.7°C) > polyU (276.2°C) > polyC (255°C) > polyA (245.7°C) > ДНК (160°C).

Различная термостабильность однородных полинуклеотидов указывает на зависимость устойчивости ДНК от ее нуклеотидного состава.

Обнаружено, что различное содержание воды в молекуле ДНК оказывает влияние на ее термическую устойчивость: большее содержание воды соответствует меньшей устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoyer H.W., Barrett E.J. // Anal. Biochem. 1966. V.17. 344.
2. Hoyer H.W. // J. Am. Chem. Soc. 1968 V.90. 2480.
3. Hoyer H.W. // Nature. 1967. V.216. 997.
4. Olafsson P.G., Bryan A.M. // Microchim. Acta. 1970. V.871.
5. Павлова С.А., Журавлева И.В., Толчинский Ю.И. Термический анализ органических и высокомолекулярных соединений (Методы аналитической химии) - М.: Химия, 1983 - 120 с.
6. Берг Л.Г. Введение в термгرافию: Наука, 1969.-395 с.
7. Illers K. // Europ. Polym. J. 1974. V.10. P. 911-916.
8. Селихова В.М., Зубов Ю.А., Бакеев Н.Ф., Белов Г.П. // Высокомолек. соед. 1977. Т.19. 4. С. 759-764.
9. Gasan A.I., Maleev V.Y., Semonov M.A. // Studia Biophysica. 1990. V.136. 171.
10. Rupprecht A., Chandrasekaran R., Anthony L., Lee S.A., Lucan A.M., Marlowe R.L. // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. 1996. V.14. 3.
11. Уэндланд У. Термические методы анализа – М.: Мир, 1978.- 526 с.
12. Kissinger H.E. // J. Res. Nat. Bur. Standarts. 1956. V.57. 217.
13. Емельянов Ю.А., Берштейн В.А. // Физ. хим. стекла. 1985. Т.11. 4. с. 429-440.
14. Шахпаронов М.И., Дуров В.А. // ЖФХ. 1979. Т.53. 10.с. 2451-2460.
15. Havlicer J., Nicolais L. // Polymer. 1986. V.27. 6. P. 921-924.
16. Bueche E. // J. Chem. Phys. 1956. V.24. 2. P. 418-425.