

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 573.323

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕКЛОВАНИЯ ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ДНК

Г.И. Церетели, О.Л. Вавелюк, Т.В. Белополюская

Санкт - Петербургский государственный университет, НИИ Физики,
198904, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Ульяновская 1, vavol@geo.phys.spbu.ru
Поступила в редакцию 9 ноября 1998 года.

Калориметрическим методом установлена аномалия тепловых свойств денатурированной влажной ДНК, проявляющаяся в виде скачка теплоемкости, температура которого зависит от степени гидратации. Сопоставление всех термодинамических и кинетических особенностей обнаруженной аномалии с классическими признаками проявления одного из основных релаксационных процессов в твердом теле - процесса стеклования в аморфных синтетических полимерах, а также в ряде влажных денатурированных белков позволяет утверждать, что и в рассматриваемом случае наблюдается процесс стеклования, а вода при этом является естественным пластификатором. Интервал влажностей, в котором ДНК существует в виде стекла шире, а относительная величина изменения теплоемкости при расстекловывании больше, по сравнению с белками, что дает основание предполагать, что процесс стеклования играет еще большую роль в тепловых свойствах ДНК, чем белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: калориметрия, гидратация, ДНК, стеклование.

Ранее нами в целом цикле работ, посвященном изучению тепловых свойств систем белок - вода [1-3], было показано, что после денатурации как фибриллярные, так и глобулярные белки в присутствии связанной воды способны переходить в стеклообразное состояние.

В настоящей работе в продолжение этого цикла исследований выполнено детальное калориметрическое изучение тепловых свойств системы ДНК - вода с переменным содержанием воды. Проблеме гидратации ДНК посвящено достаточно большое количество работ, однако, как правило, внимание исследователей при этом сосредоточено на проблеме взаимодействия с водой ДНК в ее нативном состоянии [4]. В настоящей работе основное внимание уделено изучению тепловых свойств денатурированной ДНК. Отметим, что данные, полученные нами для нативной ДНК, находятся в хорошем согласии с результатами тепловых исследований, анализируемых в работе [4]. В результате проделанной работы было установлено, что денатурированная ДНК, содержащая воду в связанном состоянии, как и влажные белки, при охлаждении переходит в стеклообразное состояние, при этом вода в процессе стеклования играет роль естественного пластификатора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все измерения выполнены на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДСК-111 фирмы «Setaram» с согласованным с ним вычислительным комплексом Intertechnic-50 (Франция). Чувствительность микрокалориметра $3 \cdot 10^{-5}$ Дж/с. Ошибка в определении величин тепловых эффектов индуцированных теплом структурных превращений биополимера с использованием предложенного нами ранее экспериментального способа проведения базовой линии в температурном интервале перехода для процесса денатурации составляла $\pm 5\%$. Погрешность в определении абсолютных значений измеряемых температур составляла ± 0.1 °С. В качестве объекта исследования в работе использовался препарат ДНК тимуса телят фирмы «Serva».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в результате продолжительного теплового воздействия ДНК теряет способность к ренатурации. На рис.1 (кривые 2-8) приведены температурные зависимости такого денатурированного образца при различном содержании воды. Как следует из рисунка, для всех кривых температурной зависимости теплоемкости денатурированной ДНК при содержании воды более 40% характерно наличие максимума вблизи 0°С, обусловленного плавлением льда, образующегося при замораживании объемной свободной воды.

Полученные нами данные для максимального количества связываемой с ДНК воды, а также для всего хода кривой зависимости $\Delta Q_{пл}$ (СН₂О %) (рис.2б) находятся в хорошем согласии с литературными данными [4,5].

Из приведенных на рис.1 результатов наиболее важным, на наш взгляд, является установленный экспериментально факт существования аномалии температурного хода теплоемкости в виде скачка ΔC_p для образцов денатурированной ДНК, содержащих только связанную воду. Получено, что наблюдаемый скачок теплоемкости имеет величину примерно $0.42 \text{ Дж/г}\cdot\text{К}$ в пересчете на сухой вес в предположении, что теплоемкость воды равна $4.18 \text{ Дж/г}\cdot\text{К}$ и практически не зависит от влажности, в то время как его температура $T_{ст}$ (рис.2, кривая 1а), как и в денатурированных белках (рис.2, кривая 2а) очень сильно изменяется со степенью гидратации ДНК.

Рассматриваемая аномалия теплоемкости ранее была обнаружена нами в денатурированной ДНК с 14% воды и интерпретирована (по аналогии с исследованиями тепловых свойств белков) как калориметрическое проявление процесса стеклования [1]. В настоящей работе получены экспериментальные факты, полностью подтверждающие предложенную интерпретацию. К ним относятся, помимо зависимости температуры скачка $T_{ст}$ от содержания воды и сохранения в первом приближении величины скачка теплоемкости ΔC_p при различных степенях гидратации, полученный характер изменения температуры скачка при изменении режимов нагревания/охлаждения.

Кроме того, появление дополнительного максимума на кривой температурной зависимости теплоемкости после проведения отжига исследуемой системы и характер его изменения в зависимости от времени тепловой обработки также очень типичны для калориметрического проявления процессов стеклования.

Сопоставление всех перечисленных особенностей калориметрического проявления тепловых свойств денатурированной ДНК с типичными признаками одного из основных релаксационных процессов в твердом теле - процесса стеклования в аморфных синтетических полимерах [6], а также в ряде гидратированных денатурированных белков [1-3] безусловно доказывает, что и в данном случае имеет место процесс стеклования, а вода при этом является естественным пластификатором.

Известно, что при переходе из стекла в высокоэластическое состояние появляется новый тип теплового движения, не связанный с колебательным спектром исследуемой системы и обусловленный появлением трансляционного движения молекул [6]. В случае аморфных синтетических и денатурированных биологических полимеров это означает появление трансляционного движения отдельных сегментов молекул [6], которое, в свою очередь, и приводит к появлению инкрементов теплоемкости, сопровождающих эти процессы. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что во влажной денатурированной ДНК, как и в белках, наличие скачка ΔC_p на кривых температурной зависимости теплоемкости непосредственно связано с изменением конформационной подвижности при расстекловывании.

Далее при исследовании влияния отжига на тепловые свойства ДНК нами были получены новые интересные особенности поведения системы денатурированная ДНК - вода, указывающие на релаксационный характер исследуемого процесса. Оказалось, что наибольший по величине дополнительный максимум в области стеклования, превышающий величину самого скачка, наблюдается в тех случаях, когда стеклообразное состояние исследуемой системы получено непосредственно из ее гелеобразного состояния с содержанием воды не менее 50%. При этом было установлено, что величина наблюдаемого дополнительного максимума зависит от используемых условий проведения калориметрического опыта, уменьшаясь с понижением скорости нагревания, т.е. имеет релаксационное, а не структурное происхождение, в отличие от максимумов на кривых теплоемкости, определяемых фазовыми переходами, для которых теплота перехода не зависит от условий проведения эксперимента [6].

Этот эксперимент, на наш взгляд, демонстрирует новые неизвестные ранее особенности процесса стеклования, обусловленные специфическим взаимодействием воды с биомакромолекулой.

Необходимо отметить, что появление в исследуемой системе свободной воды препятствует описанному выше классическому калориметрическому проявлению процесса стеклования. Замерзшая свободная вода образует ледяную матрицу, которая препятствует скачкообразному изменению молекулярной подвижности собственно молекул ДНК. Наложение температурных интервалов плавления ледяной матрицы и процесса стеклования определяет сложное поведение температурной зависимости теплоемкости исследуемой системы вблизи 0°C и требует дальнейшего изучения в связи с необходимостью разделения вкладов фазовых и релаксационных переходов.

Сопоставление полученных данных с результатами исследования процесса стеклования влажных белков показывает: интервал влажностей, в котором ДНК существует в виде стекла, шире, а относительная величина изменения теплоемкости при расстекловывании больше, по сравнению с белками, что дает основание предполагать, что процесс стеклования играет еще большую роль в тепловых свойствах ДНК, чем белков.

Калориметрическое исследование стеклования денатурированной ДНК

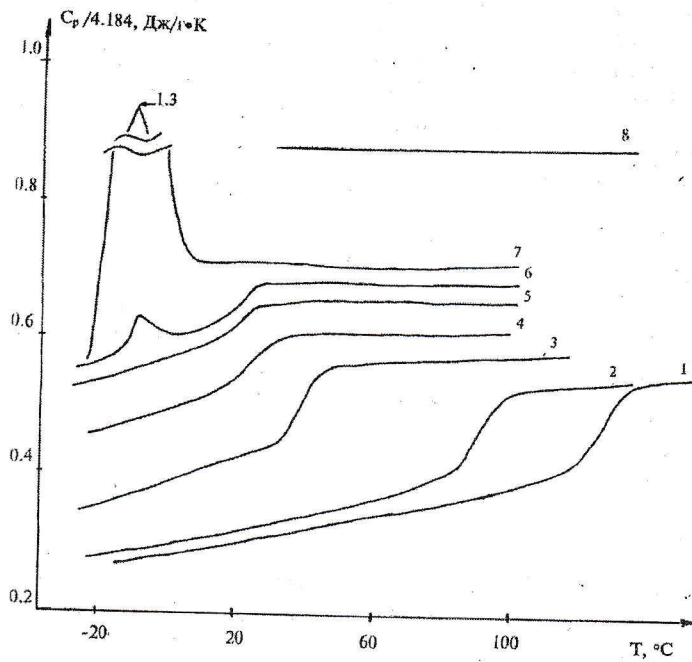


Рис.1. Температурные зависимости теплоемкости системы денатурированная ДНК - вода при различном содержании воды:
 1 - 12.8% H₂O, 2 - 17.3% H₂O, 3 - 25.0% H₂O, 4 - 32.2% H₂O, 5 - 40.7% H₂O, 6 - 44.3% H₂O, 7 - 52.3% H₂O, 8 - 79.9% H₂O.

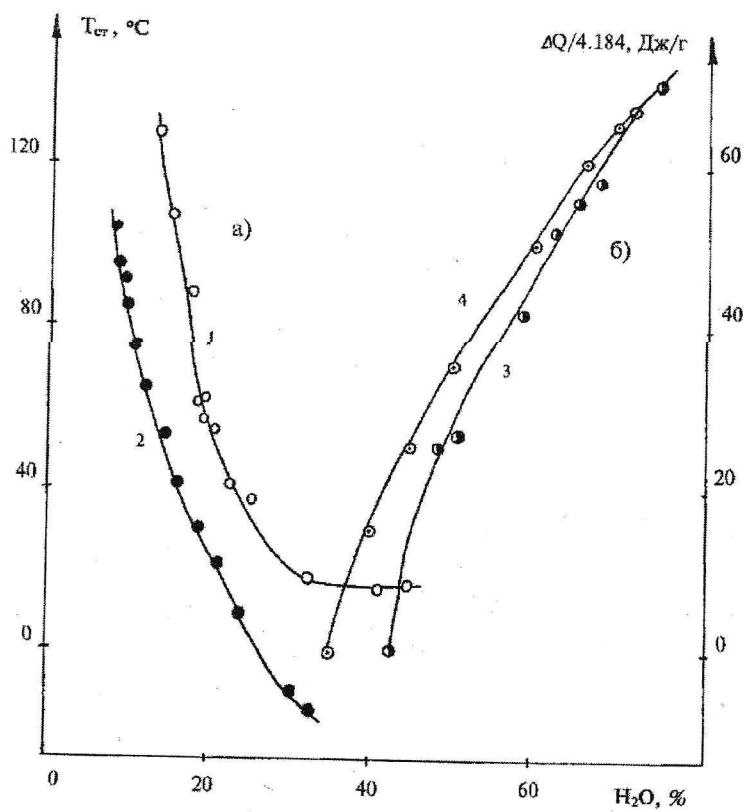


Рис.2. Зависимость тепловых свойств системы ДНК - вода от содержания воды:
 а) температуры стеклования $T_{ст}$: 1 - ДНК, 2 - аморфной желатины [2];
 б) теплоты плавления свободной воды $\Delta Q_{пл}$: 3 - денатурированной ДНК, 4 - нативной ДНК [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Церетели Г.И., Смирнова О.И. //Биофизика, 1989, т.34, вып.5, с.905-906.
2. Церетели Г.И., Смирнова О.И. //Биофизика, 1990, т.35, вып.2, с.217-221.
3. Церетели Г.И., Белополюская Т.В., Мельник Т.Н. //Биофизика, 1997, т.42, с 584-590.
4. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А.//Биофизика, 1993, т.38, вып.5, с.768-790.
5. Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул. Тбилиси, Мецниереба, 1984.
6. Годовский Ю.К. Теплофизические методы исследований полимеров. М.: Химия, 1976.