

УДК 547.963.3.

В. М. АСЛНЯН, С. Г. АРУТЮНЯН, Е. Б. ДАЛЯН, Г. С. ФАРШЯН

### ТЕРМИЧЕСКОЕ ПЛАВЛЕНИЕ ДНК ПРИ ЩЕЛОЧНЫХ pH

Исследованы особенности термического плавления ДНК при щелочных pH. Выяснилось, что в области  $pH > 10,7$  происходит конформационный переход ДНК в пределах В-семейства форм. Предложили механизм депротонирования азотистых оснований.

Из-за отсутствия совершенной экспериментальной базы и неточных определений констант ионизации азотистых оснований выводы работ, посвященных изучению плавления ДНК в широкой области изменения pH (см., напр., [1]), были сделаны не совсем корректные. Поэтому в одной из последних работ [2] экспериментально и теоретически весьма тщательно было исследовано термическое плавление ДНК в области кислых pH с учетом различий в константах ионизации оснований. На кривой зависимости  $\Delta T(pH)$  был получен минимум, наличие которого объяснялось конкретным механизмом протонирования оснований.

Мы предположили, что и при щелочных pH должен наблюдаться минимум на кривой зависимости  $\Delta T(pH)$ . На рис. 1 приведены зависимости температуры ( $T_m$ ) и интервала ( $\Delta T$ ) плавления ДНК от pH. (Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP-8000 при непрерывном режиме нагрева со скоростью  $0,25^\circ/\text{мин}$ ). Мы видим, что зависимость  $\Delta T(pH)$  проходит через минимум при  $pH \sim 10,4$ . Этот эффект не был замечен другими авторами, возможно, также и потому, что промежутки между значениями pH экспериментальных точек брались большие (0,5 ед. pH).

Попытаемся объяснить механизм воздействия на ДНК щелочных pH. В работе [3] приведены данные ряда авторов по определению мест ионизации азотистых оснований. Согласно этим исследованиям на свободных основаниях депротонируются при щелочных pH атомы N(1) гуанина ( $pK=9,4$ ) и N(3) тимина ( $pK=10,0$ ) при ионной силе  $0,1 M [Na^+]$  и  $25^\circ C$ . Поскольку эти атомы участвуют в образовании водородных связей между нитями ДНК, их депротонирование происходит только в расплавленных участках (разрыв водородной связи энергетически невыгоден). Тогда уменьшение  $T_m$  и  $\Delta T$  в интервале  $9,2 < pH < 10,2$  обусловлено ионизацией сначала гуанина, а затем тимина в расплавленном состоянии. Дальнейшее увеличение  $\Delta T$  с одновременным понижением  $T_m$  означает, что, по-видимому, происходит ионизация ГЦ-пар в спиральном состоянии [4].

С целью проверки этого предположения нами было проведено исследование спектров кругового дихроизма (КД) ДНК в области  $pH > 9,0$ . (Спектры КД снимались на дихрографе Roussel-Jouan-II). Анализ кривых на рис. 2 показал, что эффект «предплавления» исчезает при  $pH > 10,7$ . Это означает, что депротонирование ГЦ-пар в спиральном

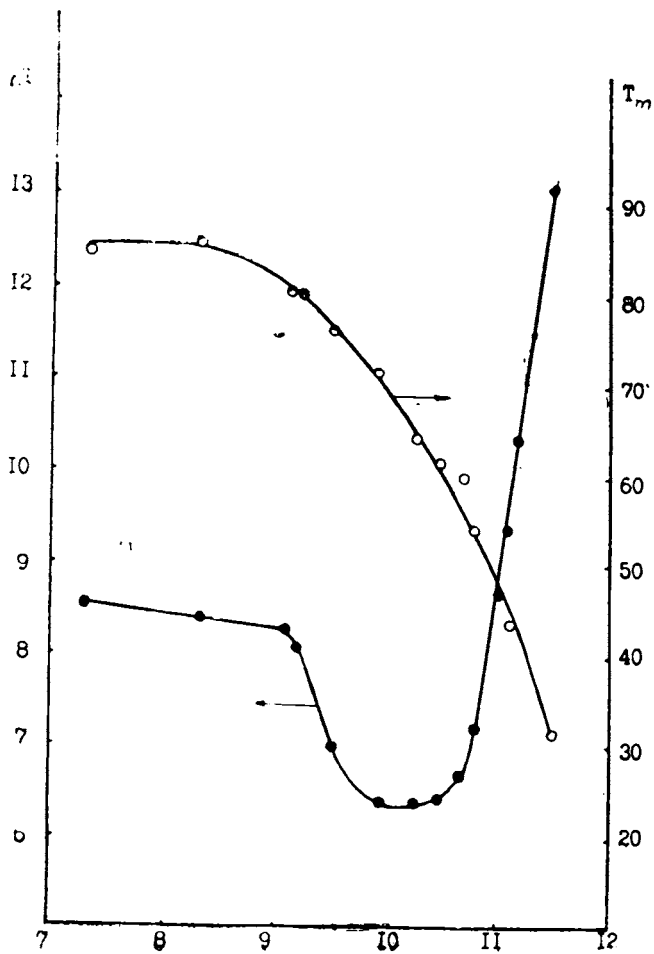


Рис. 1. Изменение  $T_m$  и  $\Delta E$  ДНК тимуса телят-ка в 0,1 н боратном бу-фере с изменением рН.

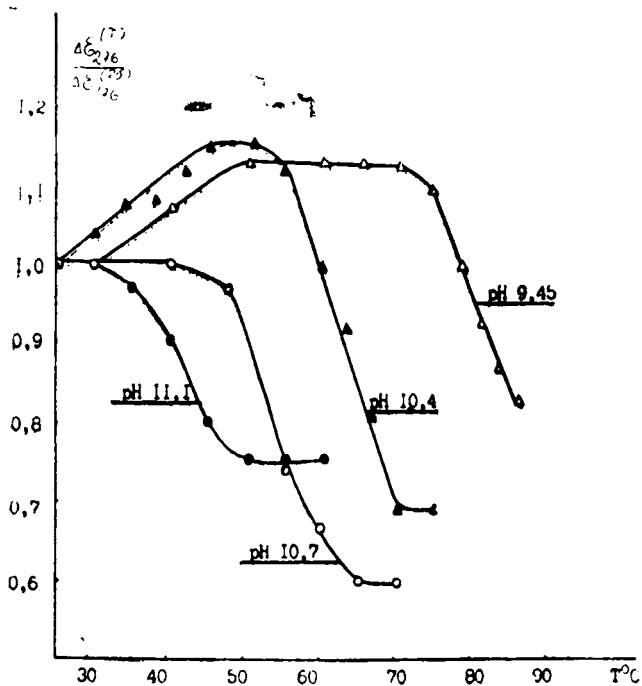


Рис. 2. Относительное изменение полосы  $\Delta E_{276}$  спектров КД ДНК тимуса телят-ка с температурой при различных рН среды.

состоянии уже привело к ослаблению и раскручиванию спирали ДНК, поэтому дополнительное раскручивание под действием температуры до начала плавления (эффект «предплавления») не наблюдается, как это видно из рис. 2, для  $pH \geq 10.7$ . Таким образом, можно заключить, что при  $pH \geq 10.7$  ДНК переходит в некую более раскрученную форму по сравнению с В-формой. Как показано в [5], при этих значениях  $pH$  происходит резкое падение энтальпии перехода, что свидетельствует об уменьшении гидратации ДНК. Это обстоятельство наряду с выводами работы [6] еще раз подтверждает, что в области  $pH \geq 10.7$  происходит конформационный переход ДНК в некую «А-подобную» форму, которая характеризуется меньшей гидратацией по сравнению с В-формой.

Кафедра молекулярной физики и биофизики

Поступило 27.02.1986

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сухоруков Б. И. Мошковский Ю. Ш., Бирштейн Т. М., Лыццов В. Н. Оптические свойства и молекулярное строение нуклеиновых кислот. II. Спектроскопическое исследование перехода «спираль-клубок» в ДНК при разных температурах и  $pH$ .—Биофизика, 1963, т. 8, с. 294.
2. Ландо Д. Ю., Кульба А. М., Ахрем А. А. Влияние лигандов с избирательным характером взаимодействия на переход спираль-клубок ДНК. IV. Тепловая денатурация ДНК в кислой среде.—Мол. биол., 1981, т. 15, с. 1093.
3. Кочетков Н. К., Будовский Э. И. Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970.
4. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю. Влияние лигандов с избирательным характером взаимодействия на переход спираль-клубок ДНК. III. Расчет кривых плавления комплексов ДНК с лигандами.—Мол. биол., 1981, т. 15, с. 1083.
5. Привалов П. Л. Теплота плавления двойной спирали ДНК.—Мол. биол., 1969, т. 3, с. 690.
6. Асланян В. М., Арутюнян С. Г. Конформационное состояние ДНК в водных растворах, содержащих глицин,  $\beta$ -аланин и  $\gamma$ -АМК. Влияние температуры.—Биофизика, 1985, т. 30, с. 741.

Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Ս. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ե. Բ. ԴԱՅԱՆ, Հ. Ս. ՆԱՐԵՅԱՆ

ԴՆԹ-ի Ջերմաստիճանի ԶավոնիՄը Հիմնաստիճանի  $pH$ -երի Դեգրեմիտ

#### Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել են ԴՆԹ-ի ջերմային հալման առանձնահատկությունները հիմնային  $pH$ -երի դեպքում: Պարզվել է, որ  $pH > 10.7$  տիրույթում տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի կոնֆորմացիոն անցում  $\overline{B}$ -ընտանիքի սահմաններում: Առաջարկվել է ազոտական հիմքերի դեպրոտոնացման մեխանիզմ: