

Maria Lidwin, Tadeusz Wilczok

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej,
Śląskiej Akademii Medycznej
w Katowicach

SPEKTROPOLARYMETRYCZNE POMIARY TERMICZNEGO PRZEJŚCIA FAZOWEGO DNA

Streszczenie. Przeprowadzono badania zależności skręcalności właściwej od temperatury dla kwasu dezoksyrybonukleinowego rozpuszczonego w 0,1 m, 0,01 m, 0,001 m roztworach NaCl.

Pomiary wykonano na spektropolarymetrze przy długościach fali $\lambda = 365$ nm, 436 nm, 578 nm, 589 nm. Zaobserwowano niewielki wzrost skręcalności właściwej $[\alpha]_{\lambda}$ poniżej temperatury termicznego przejścia fazowego. Wykazano zmiany konformacyjne w makromolekułach DNA przed zasadniczą zmianą struktury DNA z bispirali w kłębek. Te nie wyjaśnione dotąd zmiany struktury DNA poniżej temperatury termicznego przejścia fazowego nie są rejestrowane innymi metodami spektrofotometrycznymi.

Stwierdzono również niejednakowy wzrost skręcalności właściwej $[\alpha]_{\lambda}$ przy powolnym ochładzaniu całkowicie zdenaturowanego DNA dla różnych stężeń NaCl.

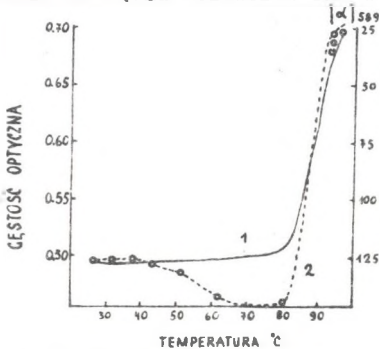
Badania struktury makromolekuł biologicznie aktywnych, oparte są o metody spektrofotometrii w ultrafiolecie i podczerwieni oraz rentgenografii. Metody te wymagają specjalnego i skomplikowanego przygotowywania próbek makromolekuł dla pomiarów. Jak wynika z badań Doty i wsp. [1], Fresco [2] oraz Ts'o i Helmkamp [3], również metody spektropolarymetryczne pozwalają na analizę zmian strukturalnych w makromolekułach. Poprzez bezpośredni pomiar kąta skręcalności płaszczyzny polaryzacji α , przy danej długości fali λ oraz zmian skręcalności wraz ze zmianą długości fali, czyli tzw. dyspersją optyczną, można wyznaczyć zmiany konformacyjne białek, polinukleotydów i kwasów nukleinowych.

Ze względu na możliwość użycia do pomiarów spektropolarymetrycznych roztworów o dużym stężeniu biopolimeru, metoda ta nadaje się również do interpretacji zmian konformacyjnych makromolekuł kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). Skręcalność płaszczyzny polaryzacji α , dla stężonych roztworów DNA o stężeniu około 1 mg/cm³, wynosi zaledwie kilka dziesiątych stopnia. W związku z tą niewielką wartością skręcalności α , zastosowanie spektropolarymetrii do badania zmian strukturalnych DNA stało się możliwe dopiero przy użyciu spektropolarymetrów o dokładności tysięcznych części stopnia.

Skręcalność właściwa $[\alpha]_{\lambda}$, określona wzorem $[\alpha]_{\lambda} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$, gdzie α - skręcalność w $[\text{°}]$, c - stężenie roztworu w g/m³, l - długość kuwety w [dm].

wynosi dla DNA: $[\alpha]_{\lambda} = 124^{\circ}$. Wartość tę uzyskujemy, np. przy stężeniu DNA równym 1 mg/cm^3 , dla kuwety o $l = 1 \text{ dm}$ i dla $\alpha = 0,124^{\circ}$. Skręcalność właściwa $[\alpha]_{\lambda}$ DNA jest kilkakrotnie większa od $[\alpha]_{\lambda}$ dla nukleotydów, z których zbudowane są molekuly DNA. DNA jako mieszanina równych ilości mononukleotydów purynowych i pirymidynowych, powinien posiadać skręcalność właściwą $[\alpha]_{\lambda}$ w przybliżeniu równą zeru. Wynika to, z dodawania wartości $[\alpha]_{\lambda}$ monodezoksyrybonukleotydów pirymidynowych ($[\alpha]_{589\text{nm}} = -34^{\circ}$) i monodezoksyrybonukleotydów purynowych ($[\alpha]_{589\text{nm}} = +31^{\circ}$) [2]. Bardzo wyraźna różnica występująca pomiędzy rzeczywistą wartością skręcalności właściwej dla DNA a wartością wyliczoną, świadczy wyraźnie o uporządkowanej strukturze przestrzennej cząsteczki DNA, w porównaniu z jej nukleotydowymi składnikami.

Makromolekuly DNA w wodnych roztworach NaCl występują w konfiguracji bispirali. W wyniku działania czynników denaturacyjnych, prowadzących do rozerwania wiązań wodorowych Watsona-Cricka [4], dochodzi do rozejścia się spiralnie skręconych molekuł DNA i do utworzenia konfiguracji nieuporządkowanego strukturalnie kłębka. Proces przejścia pomiędzy strukturą bispirali i kłębka prowadzi do istotnych zmian konformacyjnych w makromolekule DNA i nazywany jest przejściem fazowym spirala-kłębek [5]. Zgodnie z danymi Marmura i Doty [5], termiczne przejście fazowe spirala-kłębek charakteryzuje konformację molekuł DNA w stanie natywnym i zdenaturowanym. Proces ten analizowany jest zwykle spektrofotometrycznie przy $\lambda = 260 \text{ nm}$ co ogranicza stężenie roztworu DNA do około $0,02\text{--}0,03 \text{ mg/cm}^3$. Stężenie to nie pozwala na obserwację zmian konformacyjnych w zakresie temperatur do około 60°C (dla roztworów DNA w $0,01 \text{ M NaCl}$), gdyż pomiar spektrofotometryczny polega w zasadzie jedynie na re-



Rys. 1. Krzywe termicznego przejścia fazowego DNA

1. Gęstość optyczna w 259 nm , 2. skręcalność właściwa $[\alpha]_{\text{D}}$

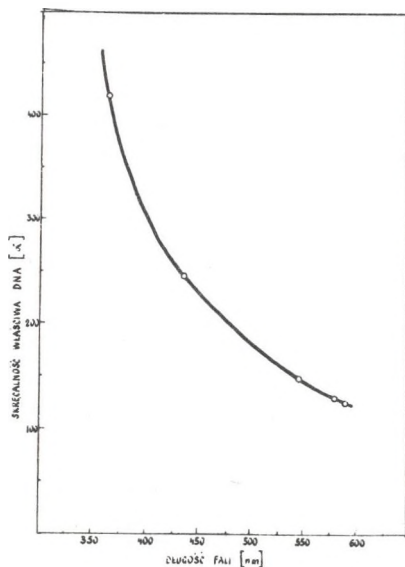
jestracji efektu hiperchromatycznego spowodowanego rozerwaniem wiązań Watsona-Cricka. Duże stężenia DNA stosowane w metodzie spektropolarymetrycznej, wynoszące około 1 mg/cm^3 , pozwalają na uchwycenie zmian konformacyjnych w makromolekułach DNA, nieregistrowanych metodą spektrofotometrii UV.

Porównanie krzywych termicznego przejścia fazowego dla DNA wyznaczonych metodą spektrofotometrii UV i spektropolarymetrii, przedstawione jest na Rys. 1.

Pomiary skręcalności właściwej $[\alpha]_{\lambda}$ roztworów DNA, wykonano na spektropolarymetrze firmy Perkin-Elmer typ 141. Przyrząd ten umożliwił wyznaczenie skręcalności właściwej przy długościach fali $\lambda = 589 \text{ nm}$, 578 nm , 546 nm , 436 nm i 365 nm . Dokładność pomiarów kąta skręcalności $\alpha = \pm 0,002^{\circ}$. Kuwe-

ta szklana o długości $l = 1$ dm i pojemności 5 cm^3 , otoczona płaszczem wodnym połączonym z ultratermostatem, pozwalała mierzyć skręcalność w zakresie temperatur $20\text{--}100^\circ\text{C}$.

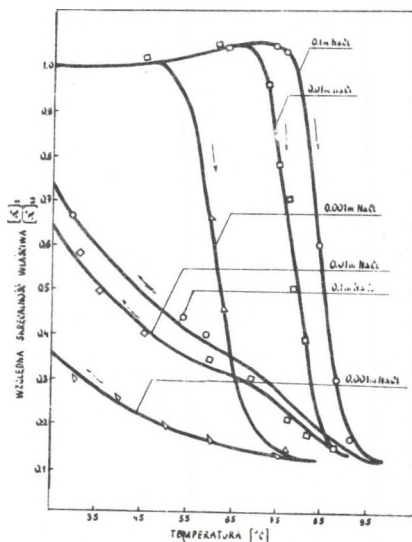
Fizyko-chemiczna charakterystyka molekuł DNA stosowanych w pomiarach spektropolarymetrycznych opisana została szczegółowo w poprzedniej pracy [6]. Ciężar cząsteczkowy DNA wyznaczony poprzez pomiar lepkości wewnętrznej $[\eta]$ wynosi $6,3 \cdot 10^6$. Wyznaczono zależność skręcalności właściwej $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}$ od długości fali λ , dla bispiralnego DNA rozpuszczonego w roztworach o różnych stężeniach NaCl. Pomiary wykonano dla 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 molowych roztworów NaCl przy stężeniu DNA $C = 0,916 \text{ mg/cm}^3$. Jak wynika z pomiarów, im mniejsza jest długość fali λ , tym większa jest skręcalność właściwa $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}$. Wzrost $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}$ nie jest proporcjonalny do zmniejszania się wartości λ . Przebadana zależność skręcalności właściwej $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}$ od długości fali λ dla DNA w 0,01 m roztworze NaCl przedstawiona jest na Rys. 2.



Rys. 2. Zależność skręcalności właściwej $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}$ od długości fali λ roztworu DNA w 0,01 m NaCl

Podobne krzywe uzyskano dla wszystkich roztworów DNA o stężeniach NaCl (0,001 m, 0,1 m, 1,0 m). Uzyskane wyniki $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}$ pozwoliły na wyznaczenie długości fali $\lambda = 436 \text{ nm}$, jako długości fali przy której pomiary skręcalności α są obarczone najmniejszym błędem. Badania wpływu temperatury na skręcalność właściwą $[\alpha]_{\lambda}$ DNA, przeprowadzono umieszczając roztwór DNA w termostатовanej kuwecie połączonej z ultratermostatem o regulowanej szybkości zmian temperatury. Szybkość ta wynosiła $0,3^\circ\text{C}/\text{min}$. Marmur, Rownd i Schildkraut [7] wykazali, że przy wzroście stę-

żenia NaCl w roztworze DNA, termiczne przejście spirala-kłębek zachodzi przy wyższych temperaturach. W naszej pracy wykazaliśmy, że przesunięcie to jest również obserwowane przy pomiarach spektropolarymetrycznych. Zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_{\lambda}$ roztworów DNA przy $\lambda = 436$ nm w zależności od temperatury dla 3 stężeń NaCl (0,001 m, 0,01, 0,1 m) przedstawiono jako funkcję $\frac{[\alpha]_t}{[\alpha]_{25^{\circ}\text{C}}} = f(t)$ na Rys. 3.



Rys. 3. Zmiany skręcalności właściwej DNA $[\alpha]_{436}$ nm w zależności od temperatury, w czasie termicznego przejścia fazowego przy różnych stężeniach NaCl

OOO - 0,1 m NaCl, □□□ - 0,01 m NaCl, ΔΔΔ - 0,001 m NaCl

Widoczny na wszystkich krzywych niewielki przyrost skręcalności właściwej $[\alpha]_{\lambda}$, przy wzroście temperatury w zakresie 25-50°C dla DNA w 0,001 m NaCl, dowodzi istnienia niewyjaśnionych zmian struktury drugorzędowej bispirali DNA przed przejściem fazowym spirala-kłębek. W zakresie temperatur 25-75°C wzrost $[\alpha]_{\lambda}$ dla roztworów DNA w wyższych stężeniach NaCl jest odpowiednio większy. Te anormalne zmiany w drugorzędowej strukturze DNA nie są w zasadzie widoczne na krzywych termicznego przejścia fazowego, wyznaczanych metodą spektrofotometrii UV Rys. 1. Podobne anomalie obserwuje się również w metodach wiskozymetrycznych [8]. Rys. 3 przedstawia poza krzywymi ogrzewania DNA, również krzywe otrzymane podczas powolnego ochładzania roztworów DNA, po uprzednim całkowitym termicznym przejściu fazowym. Dla każdego stężenia NaCl skręcalność właściwa $[\alpha]_{\lambda}$, w temperaturze całkowitego termicznego przejścia fazowego, wynosiła około 15% wartości początkowej $[\alpha]_{\lambda}$. Krzywe zmiany skręcalności $[\alpha]_{\lambda}$ przy ochładzaniu różnią się w swym charakterze od krzywych ogrzewania i nie wykazują cha-

rakterystycznego przegięcia. Dla DNA rozpuszczonego w roztworach o różnym stężeniu NaCl, uzyskano po ochłodzeniu do temperatury 25°C różne wartości $[\alpha]_{\lambda}$

Wartości te wynoszą odpowiednio: od 35% wartości początkowej dla 0,001 m NaCl do 175% dla 0,1 m NaCl. Różnice wartości skręcalności właściwej uzyskane po ochłodzeniu są dowodem dużego stabilizującego wpływu stężenia NaCl na drugorzędową strukturę DNA. Przy powtórnyim ogrzewaniu DNA zmiany wartości $[\alpha]_{\lambda}$ są identyczne jak w procesie chłodzenia.

Zjawiska te stanowią podstawę dla badania mechanizmu procesu odwracalnej denaturacji makromolekuł DNA.

LITERATURA

- [1] Doty P., Boedtker H., Fresco H.R. - Proc.Natl.Acad.Sci. US. 45, 482, 1959.
- [2] Fresco J.R. - Tetrahedron, 13, 185, 1961
- [3] Ts'o P.O.P. Helmkamp G.K. - B&B.A. 55, 584, 1962.
- [4] Watson J.D., Crick F.C.H. Nature 171, 757, 1953.
- [5] Marmur J., Doty P., - Nature 183, 1427, 1959.
- [6] Lidwin M., Wilczok T. - w tym zeszycie 00, 000, 1969
- [7] Marmur J., Rownd R., Schildkraut C.L. - Prog. in Nucleic Acid Research Vol. 1, 231. Acad.Press 1963.
- [8] Boublik M., Bartl P., Šponar J. - Coll.Czech.Chem.Comm. Vol. 32, 2201, 1967.

SPECTROPOLARIMETRIC DETERMINATIONS OF THERMAL HELIX-COIL TRANSITION OF DNA

S u m m a r y

The dependence of specific rotation $[\alpha]_{\lambda}$ on temperature for deoxyribonucleic acid was measured in 0,1 m, 0,01 m, 0,001 m NaCl solutions by a spectropolarimetric method at wavelengths $\lambda = 365 \text{ nm}, 436 \text{ nm}, 546 \text{ nm}, 578 \text{ nm}, 589 \text{ nm}$.

It was shown that $[\alpha]_{\lambda}$ increases below the temperature of the thermal helix-coil transition demonstrating conformational changes in DNA macromolecules below the helix was converted into a coil.

These conformational changes cannot be demonstrated by other spectrophotometric methods. It was also stated, that during lowering of temperature, even after a complete denaturation, the $[\alpha]_{\lambda}$ increase is not identical for various NaCl concentrations.

СПЕКТРОПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ ТЕРМИЧЕСКОГО
ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА ДНК

Резюме

Проведено исследование зависимости удельного вращения от температуры для ДНК, растворенного в 0,1 м, 0,01 м и 0,001 м растворах NaCl.

Измерения совершены на спектрополариметре при следующих длинах волны $\lambda = 365$ нм, 436 нм, 546 нм, 578 нм, 589 нм.

Замечено небольшое повышение удельного вращения $[\alpha]_{\lambda}$ ниже температуры термического фазового перехода. Указано конформационные изменения в макромолекулах ДНК перед основным переходом структуры ДНК из биспирали в клубок. Эти невыясненные до сих пор перемены структуры ДНК ниже температуры термического фазового перехода не возможно регистрировать другими спектроскопическими методами.

Подтверждено также неодинаковое повышение удельного вращения $[\alpha]_{\lambda}$ при медленном охлаждении полностью денатурированного ДНК для разных концентраций NaCl.