

Barbara Lubas, Tadeusz Wilczok

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej,
Śląskiej Akademii Medycznej
Katowice.

TECHNIKA ECHA SPINOWEGO W ZASTOSOWANIU DO BADAŃ
UWODNIENIA I RUCHLIWOŚCI MOLEKULARNEJ BIOPOLIMERÓW

Streszczenie. Scharakteryzowano metodę pozwalającą na graficzne wyznaczenie uwodnienia nierotacyjnego i czasu korelacji molekuł białek i DNA z pomiarów magnetycznych czasów relaksacji protonów T_1 i T_2 w wodnych roztworach tych związków. Czasy relaksacji T_1 i T_2 wyznaczano techniką echa spinowego na aparaturze o częstotliwości rezonansowej 14 MHz. Stwierdzono, że nierotacyjne uwodnienie makromolekuł DNA jest w stanie natywnym rzędu 8-10% wagowych i zmniejsza się w miarę spadku ciężaru cząsteczkowego. Po denaturacji uwodnienie molekuł DNA maleje. Czas korelacji DNA ma w stanie natywnym wartość $1.2 - 1.4 \cdot 10^{-8}$ s i po denaturacji wzrasta. Wyniki uzyskane dla DNA porównano wynikami uzyskanymi dla białek - owalbuminu, glikogenu i białka jaja kurzego.

Wszelkie procesy życiowe zachodzą w środowisku, które w około 80 - 90% składa się z wody, a w około 10-20% ze składników niewodnych, w tym biopolimerów czyli makromolekuł biologicznie aktywnych. Oddziaływania makromolekuł z poszczególnymi dipolami wodnymi prowadzą do strukturalnego wiązania drobin wody przez makromolekułę i tworzenia warstwy hydratacyjnej określanej również mianem uwodnienia. Znajomość uwodnienia jest bardzo istotną informacją związaną ze stabilnością i stabilizacją strukturalną biopolimeru.

Wyniki pomiarów uwodnienia biopolimerów dokonywanych różnymi metodami były dotąd bardzo rozbieżne. Również teoretyczne modele wiązania wody przez makromolekułę sprowadzić można do dwóch rozbieżnych hipotez, obu uzasadnionych z punktu widzenia termodynamiki. Według KLOTZA [1] makromolekuła wiąże dużą ilość wody, porządkując dipole wodne w postaci sieci lodopodobnej. Według KAUZMANNA [2] makromolekuły raczej unikają bezpośredniego kontaktu z fazą wodną, tworząc wiązania hydrofobowe.

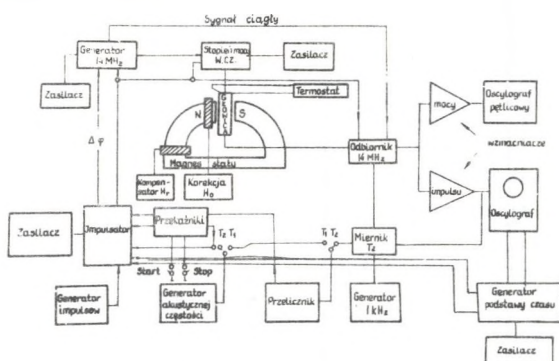
Wydaje się, że większość rozbieżności dotycząca uwodnienia biopolimerów wynikała z faktu, że stosowane do oznaczania uwodnienia metody nie pozwalały na rozróżnienie dwóch stanów wody w roztworze - drobin związanych strukturalnie przez makromolekułę i drobin jedynie uporządkowanych.

Metoda, którą przedstawiamy, umożliwia takie rozróżnienie, gdyż przy jej zastosowaniu wyznacza się tzw. uwodnienie nierotacyjne, czyli tę część

warstwy hydratacyjnej, której dipole nie rotują swobodnie w polu wysokiej częstotliwości, a więc są integralnie związane z makromolekułą.

Opracowana metoda polega na zastosowaniu techniki echa spinowego do pomiaru podłużnego T_1 i poprzecznego T_2 czasów relaksacji protonów w wodnych roztworach biopolimerów.

Technika echa spinowego stanowi impulsową modyfikację metod z zakresu magnetycznego rezonansu jądrowego. Schemat blokowy zastosowanej aparatury [3] przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1. Schemat blokowy aparatury echa spinowego

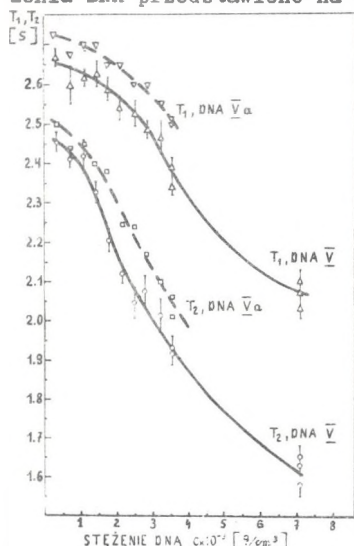
Natężenie pola magnetycznego wytworzonego przez magnes stały wynosi około 3280 gaussów i odpowiada ściśle częstotliwości rezonansowej dla protonów równej 14 MHz. Badane próbki umieszcza się w cewce odbiorczej głowicy pomiarowej i poddaje się działaniu impulsów pola wysokiej częstotliwości spełniającej warunek rezonansu. Impulsy są wytwarzane przez część nadawczą aparatury. Sygnały precesji swobodnej i echa spinowego są odbierane i wzmacniane w części odbiorczej aparatury. Mogą one być zarejestrowane niezależnie przy użyciu oscylografu lub oscylografu pętlicowego.

Pomiary podłużnego czasu relaksacji T_1 przeprowadzono metodą zerową [4] stosując trzy impulsy pola w.c.z.: π , $\pi/2$, π i obserwując pojedyncze echa spinowe. Pomiary poprzecznego czasu relaksacji T_2 przeprowadzono metodą CARRA-PURCELLA [4] w modyfikacji MEIBBOOMA-GILLA [5], stosując impuls $\pi/2$ i sekwencję n impulsów π oraz obserwując ciąg ech spinowych, których obwiednia stanowi eksponentę.

Badania przeprowadzono [6,7] w roztworach kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), izolowanego z grasicy cielęcej i porównano z rezultatami uzyskanymi poprzednio [8,9] dla białek - ovalbuminy, glikogenu i białka jaja kurzego.

Pomiary czasów relaksacji wykonywano dla DNA w stanie natywnym i zdenaturowanym oraz dla DNA o różnym ciężarze cząsteczkowym, po degradacji mechanicznej. Jako rozpuszczalników DNA używano roztworów NaCl o różnym stężeniu molowym.

Dla wszystkich roztworów DNA czasy relaksacji T_1 i T_2 były skrócone w stosunku do rozpuszczalników i malały monotonicznie ze wzrostem stężenia DNA. Typowe doświadczalne zależności czasów relaksacji roztworów od stężenia DNA przedstawiono na Rys. 2.



Rys. 2. Zależność czasów relaksacji T_1 i T_2 od stężenia DNA dla natywnego DNA V i zdenaturowanego DNA Va

Jak widać z wykresów, skrócenie poprzecznego czasu relaksacji T_2 jest większe niż podłużnego T_1 . Po denaturacji skrócenie zarówno T_1 jak i T_2 zmniejsza się.

Przeprowadzone badania spektrograficzne DNA i rozpuszczalników [7] wykluczyły obecność jakichkolwiek zanieczyszczeń paramagnetycznych, które mogłyby prowadzić do skrócenia czasów relaksacji. Skrócenie T_1 i T_2 można wobec tego zinterpretować jedynie przy założeniu szybkiej wymiany dipoli wodnych obecnych w nierotacyjnej części uwodnienia DNA z wodą swobodną.

Wymianę tę można opisać analitycznie równaniami, które wyprowadzono na podstawie teorii ZIMMERMANNNA i BRITTINA [10]. Końcowe zależności na uwodnienie nierotacyjne w_n mają postać

$$(w_n)_1 = k_1 T_{1n}; \quad (w_n)_2 = k_2 T_{2n} \quad (1)$$

gdzie T_{1n} i T_{2n} są czasami relaksacji makromolekuły, stałe k_1 i k_2 są równe

$$k_1 = \frac{1}{c} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_{1w}} \right); \quad k_2 = \frac{1}{c} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2w}} \right) \quad (2)$$

a T_{1w} i T_{2w} oznaczają czasy relaksacji rozpuszczalnika, T_1 i T_2 mierzone czasy relaksacji roztworów DNA i c stężenie DNA.

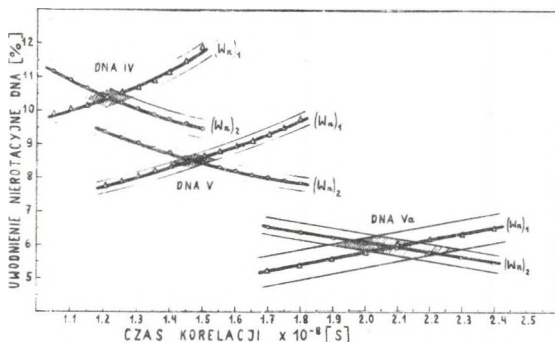
Ruch makromolekuły DNA w roztworze jest izotropowy, co przedyskutowano poprzednio [7], więc wielkości T_{1n} i T_{2n} można wyrazić według teorii SOLOMONA [11] w funkcji czasu korelacji τ oznaczającego czas obrotu drobin w roztworze o kąt równy $\sqrt{2/3}$ radiana. Wzory na T_{1n} i T_{2n} przybierają wówczas postać

$$\frac{1}{T_{1n}} = \frac{6}{20} \frac{\gamma^4 \mu^2}{b^6} \left[\frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right] \quad (3)$$

$$\frac{1}{\pi \tau_{2n}} = \frac{3}{20} \frac{\gamma^4 h^2}{b^6} \left[3\tau + \frac{5\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{2\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right] \quad (3)$$

gdzie γ oznacza czynnik giromagnetyczny dla protonu, h stałą Plancka, b odległość między protonami w drobinie wody, równą 15.15 nm [12], a ω częstość rezonansowa, w naszym przypadku równą $\omega = 2\pi \cdot 14$ MHz.

Przez kombinację równań (1) i (3) uzyskujemy układ dwóch równań z niewiadomymi w_n i τ . W dowolnym zakresie czasów korelacji najdogodniej jest rozwiązać ten układ metodą graficzną. Przykładowe rozwiązania przedstawiono na Rys. 3.



Rys. 3. Graficzne wyznaczenie uwodnienia nierotacyjnego i czasu korelacji DNA dla natywnego DNA IV i DNA V oraz dla zdenaturowanego DNA Va

Krzywe wzrastające wyliczono na podstawie wartości $(w_n)_1$, a krzywe malejące - na podstawie wartości $(w_n)_2$. Współrzędne punktów przecięcia przedstawionych krzywych stanowią rozwiązanie skonstruowanego układu. Linie skrajne oznaczają wykresy dla wartości k_1 i k_2 z uwzględnieniem dokładności ich wyznaczenia z pomiarów T_1 i T_2 . Obszary zakreskowane oznaczają pole niepewności wyników.

Wyniki obliczeń uwodnienia nierotacyjnego i czasu korelacji DNA zestawiono w Tabeli 1 i porównano z analogicznymi parametrami wyznaczonymi dla białek.

Maksymalny błąd względny oznaczenia wartości uwodnienia jest rzędu 5%, a maksymalny błąd względny oznaczenia czasu korelacji - rzędu 10%.

Wykazano, że uwodnienie nierotacyjne makromolekuł ma wartość niewielką osiagającą w stanie natywnym maksymalnie wartość $w_n = 11.25\%$ dla molekuł DNA o największym ciężarze cząsteczkowym.

Po denaturacji uwodnienie DNA wyraźnie maleje dla wszystkich badanych preparatów. Zmniejszenie uwodnienia obserwuje się również w miarę spadku ciężaru cząsteczkowego DNA.

Tabela 1

Wyniki obliczeń uwodnienia nierotacyjnego w_n i czasu korelacji τ dla DNA z grasicy cielęcej i dla białek

| Biopolimer | Stężenie molowe NaCl | Mx10 ⁶ | Stan natywny | | Stan zdenaturowany | |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|--------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | | w_n [%] | $\tau \cdot 10^{-8}$ [s] | w_n [%] | $\tau \cdot 10^{-8}$ [s] |
| DNA IV/65 | 0.15 | 7.70 | 10.10 | 1.21 | - | - |
| DNA V/65 | 0.15 | 6.00 | 8.55 | 1.47 | 5.95 | 2.09 |
| DNA XIII/66 | 0.02 | 8.66 | 11.25 | 1.93 | 6.07 | 2.71 |
| DNA XIII/66a | 0.02 | 6.50 | 8.50 | 1.55 | 4.90 | 2.28 |
| DNA XIII/66b | 0.02 | 4.52 | 4.60 | 1.30 | 3.45 | 1.87 |
| Białko jaja kurzego (8) | roztwory | | 1.97 | 1.20 | 12.30 | 3.25 |
| Ovalbumina (8) | wodne | | 1.60 | 1.03 | 8.70 | 2.63 |
| Glikogen (9) | | | 5.26 | 2.01 | - | - |

Z porównania uwodnienia DNA i białek widać, że uwodnienie nierotacyjne białek ma w stanie natywnym wartości o wiele niższe niż uwodnienie nierotacyjne DNA. W skrajnych przypadkach jest ono dla DNA ponad siedmiokrotnie wyższe niż dla ovalbuminy. Ponadto relacja uwodnienia nierotacyjnego w stanie natywnym i zdenaturowanym jest dla białek i DNA zupełnie inna. Dla białek uwodnienie nierotacyjne pod wpływem denaturacji kilkukrotnie wzrasta, dla DNA - wyraźnie maleje.

W świetle tych wyników wydaje się, że nie można generalizować problemu uwodnienia wszystkich biopolimerów. O ile dla białek uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę wiązań hydrofobowych KAUZMANNA [1], które ulegając, zerwaniu w czasie denaturacji mogą prowadzić do odsłonięcia grup polarnych i wiązania większej ilości wody, dla DNA nie znajdujemy potwierdzenia tej hipotezy.

Czas korelacji τ , wyznaczony dla molekuł DNA w stanie natywnym ma wartości porównywalne z analogicznymi wartościami τ dla białek, choć ciężar cząsteczkowy DNA jest o dwa rzędy wielkości większy od ciężaru cząsteczkowego badanych białek. Wynik ten dowodzi wyjątkowo szybkiej rotacji molekuł DNA w roztworze w stosunku do ich wielkości.

Degradacja DNA, prowadząca do spadku ciężaru cząsteczkowego statystycznej molekule, prowadzi zarówno w stanie natywnym jak i zdenaturowanym do zmniejszenia czasu korelacji, a więc i zwiększenia szybkości rotacji DNA. Za to denaturacja zarówno DNA jak i białek prowadzi do wyraźnego wzrostu czasu korelacji, a więc i ograniczenia ruchliwości molekularnej tych biopolimerów.

LITERATURA

- [1] Klotz., I.M., Brookhaven Symp., 13, 25 (1960)
- [2] Kausmann W., Adv. Protein Chem., Vol. 14 (1959)
- [3] Daszkiewicz, O.K., Praca doktorska, U.J. Kraków, 1965
- [4] Carr, H.Y., Purcell, E.M., Phys. Rev., 94, 630 (1954)
- [5] Meiboom, S., Gill, D., Rev. Sci. Instr., 29, 688 (1958)
- [6] Lubas, B., Wilczok T., Biochim. Biophys. Acta, 120, 427 (1966)
- [7] Lubas, B., Praca doktorska, Sl.A.M. Katowice 1968
- [8] Daszkiewicz, O.K., Hennel, J.W., Lubas B., Szczepkowski T.W., Nature 200, 1006 (1963)
- [9] Caputa K., Daszkiewicz O.K., Hennel J.W., Lubas, B., Szczepkowski, T.W., Proc. XIII th Colloque Ampere, Leuven, September 1964
- [10] Zimmermann, J.R., Brittin, W.E., J. Phys. Chem. 61, 1328 (1957)
- [11] Solomon I., Phys. Rev., 99, 559 (1955)
- [12] Landolt-Börnstein, Zahlenwerte und Funktionen, 6 Aufl., I Band Springer, Berlin 1955.

STUDY OF HYDRATION AND MOLECULAR MOBILITY OF BIOPOLYMERS
BY SPIN-ECHO TECHNIQUE

S u m m a r y

The method for graphical determination of the nonrotational hydration and correlation time of the proteins and DNA molecules was described. Measurements of proton magnetic relaxation times T_1 and T_2 in aqueous solutions of biopolymers were performed. The relaxation times T_1 and T_2 were measured by spin echo technique on an apparatus with resonance frequency of 14 MHz. It was found, that the nonrotational hydration of DNA macromolecules reaches in native state the value of 8-10 weight per cent and decreases with decreasing of the molecular weight. After denaturation the hydration of DNA molecules decreases. The correlation time for DNA in native state was found as $1.2-1.4 \cdot 10^{-8}$ s and after denaturation an increase was observed. The results obtained for DNA were compared with data for proteins - ovalbumin, glicogen and egg white.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СПИН-ЭХО ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИДРАТАЦИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОДВИЖНОСТИ БИОПОЛЫМЕРОВ

Р е з ю м е

Из времени магнитной релаксации протонов T_1 и T_2 в водных растворах белка и ДНК, графически получено величину неротационной гидратации и время корреляции этих макромолекул. Применение метода спин-эхо разрешило измерить время релаксации T_1 и T_2 на установке для частоты резонанса 14 Мгц. Определено, что величина неротационной гидратации макромолекул ДНК для нативного состояния равна 8-10% вес. и снижается в зависимости от понижения молекулярного веса молекулы. После денатурации гидратация ДНК понижается. В нативном состоянии время корреляции ДНК имеет величину $1.2 - 1.4 \cdot 10^{-9}$ сек., а после денатурации увеличивается.

Результаты получены для ДНК сравнено с результатами полученными для белков.