

## ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ СВОЙСТВА ДНК: ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТИ И КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЕ КРИВЫЕ ПЛАВЛЕНИЯ КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ БЕССОЛЕВЫХ РАСТВОРОВ

И. А. Кузнецов, Н. В. Аполонник, И. С. Шкловер

**Введение.** Электрический ток в растворах электролитов возникает за счет упорядоченного перемещения ионов из одного равновесного состояния в другое с преодолением потенциального барьера, равного энергии активации электропроводности ( $E_a$ ). Наличие этого барьера обусловлено квазиупорядоченным строением жидкости и находится в соответствии с тем, что все процессы, протекающие с конечной скоростью (в том числе и процесс перемещения ионов в растворе под действием градиента потенциала), требуют затраты минимальной энергии, которую система должна получить для того, чтобы они стали возможными.

Удельная электропроводность ( $\kappa$ ) растворов электролитов увеличивается с ростом температуры в соответствии с уравнением, аналогичным известному в кинетике химических реакций уравнению Аррениуса [1]:

$$\kappa = A \exp \left[ -\frac{E_a}{RT} \right], \quad (1)$$

где  $E_a$  — энергия активации электропроводности;  $R$  — универсальная газовая постоянная;  $A$  — константа. Из уравнения (1) следует, что если  $A$  и  $E_a$  не зависят от температуры, то должна существовать линейная зависимость электропроводности от обратной температуры, из которой легко определить величину  $E_a$ . Будем для краткости называть ее зависимостью Аррениуса.

Для водных растворов хлоридов щелочных металлов величина  $E_a$  в зависимости от природы катиона составляет 12—17 кДж/моль. На кривой зависимости электропроводности бессолевого раствора Na-ДНК от температуры Василеску и др. обнаружили излом при 295 К. Величины  $E_a$  оказались равными 12,0 и 17,0 кДж/моль в интервале температур до и после излома соответственно. Авторы объяснили излом «эффектом предплавления», который характерен только для бессольевых растворов [2].

В настоящей работе исследована температурная зависимость электропроводности некоторых солей нативной (ДНК-I) и денатурированной (ДНК-II) ДНК в более широком, чем в работе [2], интервале температур (290—333 К). Показано, что для ДНК-I на кривой зависимости в координатах Аррениуса наблюдаются два излома, а для ДНК-II на аналогичной кривой изломов нет. Величины  $E_a$  для ДНК-I до первого и после второго излома, а также для ДНК-II во всем изученном интервале температур одинаковы и практически совпадают со значениями  $E_a$  для соответствующих противоионов. В то же время для ДНК-I в интервале температур от первого до второго излома  $E_a$  почти в два раза больше. Сделана приближенная оценка доли освобождающихся при термической денатурации ДНК противоионов.

**Материалы и методы.** Исходным препаратом служила Na-соль ДНК из эритроцитов цыплят («Reanal», ВНР).

Для приготовления растворов Na-ДНК-I растворяли 2 г исходного препарата в 1 л деионизованной воды. Показано, что в концентрированных бессольевых растворах ДНК является нативной [3].

Соли ДНК-II получали, используя промежуточную стадию перевода Na-ДНК в H-ДНК (изоионный раствор) и пропуская раствор через колонку со смешанным слоем ионоитов. Затем изоионный раствор медленно фильтровали через колонку с катионитом в требуемой форме. Полученные таким способом соли ДНК являются денатурированными [4].

Концентрацию ДНК определяли методом Спирна [5]. Растворы хранили при 4 °С. Сопротивление растворов измеряли на прецизионном кондуктометре фирмы «ЛКВ» (Швеция) с точностью  $\pm 0,25$  % при частоте переменного тока 2 кГц. Использовали термостатированную проточную ячейку с постоянной, равной  $0,049 \text{ см}^{-1}$  при 25 °С. Удельную электропроводность вычисляли по формуле:

$$\kappa = \frac{K}{R}, \quad (2)$$

где  $K$  — постоянная ячейки;  $R$  — сопротивление раствора. При этом учитывали зависимость  $K$  от температуры [6]. Эквивалентную электропроводность растворов рассчитывали по уравнению:

$$\lambda = \frac{\kappa \cdot 10^3}{C_p}, \quad (3)$$

где  $C_p$  — концентрация ДНК в растворе в расчете на моль нуклеинового фосфора.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 приведены кривые зависимостей удельной электропроводности от температуры в координатах Аррениуса для растворов Na-ДНК-I различной концентрации. На каждой из кривых имеются три линейных участка:  $ab$ ,  $bc$  и  $cd$ , причем наклоны  $ab$  и  $cd$  практически одинаковы при всех концентрациях.

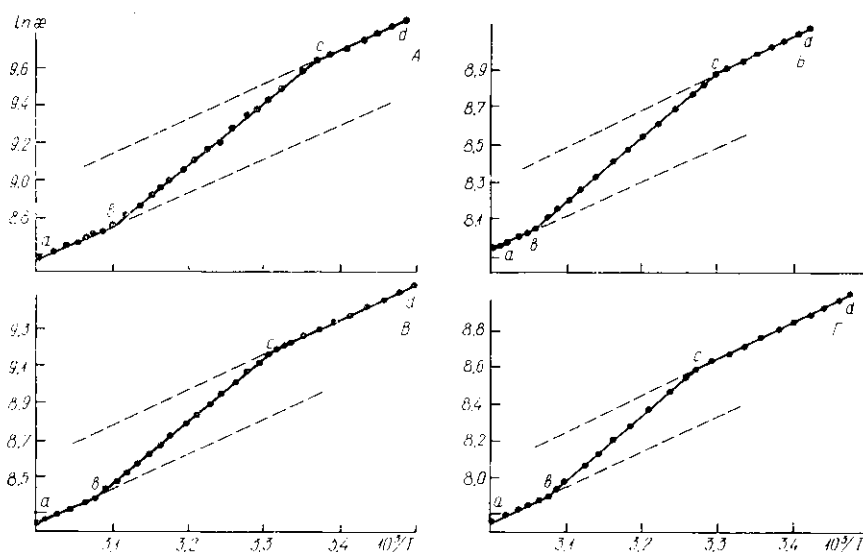


Рис. 1. Зависимость удельной электропроводности от температуры для растворов Na-ДНК-I различной концентрации:  $C_p = 1,48 \cdot 10^{-3}$  (А);  $3,40 \cdot 10^{-3}$  (Б);  $2,21 \cdot 10^{-3}$  (В);  $4,43 \cdot 10^{-3}$  М (Г)

Fig. 1. Arrhenius plot of  $\log \kappa$  as a function of  $10^3/T$  for different concentrations of Na-DNA-I in salt-free solutions

На рис. 2 температуры ( $T_{1/2}$ ), соответствующие серединам участков  $bc$ , отложены от логарифма концентрации нуклеинового фосфора. Эту зависимость можно описать уравнением:

$$T_{1/2} = 20,0 \lg C_p + 363,5. \quad (4)$$

Уравнение (4) практически совпадает с уравнением, полученным при изучении плавления ДНК методом микрокалориметрии [7]:

$$T_{пл} = 18,3 \lg C_p + 363,2, \quad (5)$$

в котором  $T_{пл}$  — температура плавления Na-ДНК в концентрированных бессольевых растворах. Уравнение (4) отличается от (5) только величиной наклона  $dT/d \lg C_p$ . Согласно данным, приведенным в обзоре [8], величина  $dT/d \lg C_s$ , где  $C_s$  — концентрация поддерживающего

электролита, заметно возрастает с уменьшением рН. Исходя из этого, полученный нами более высокий наклон можно объяснить тем, что, хотя измерения электропроводности проводили в атмосфере аргона, в отсутствие буфера значение рН растворов должно быть меньше 7,0. Таким образом, сходство уравнений (4) и (5), вероятно, объясняется соответствием участков *bc* (рис. 1) процессу термической денатурации ДНК, а сами кривые можно рассматривать как кондуктометрические кривые плавления.

Этот вывод подтверждается тем, что на кривой зависимости электропроводности от температуры в координатах Аррениуса для растворов

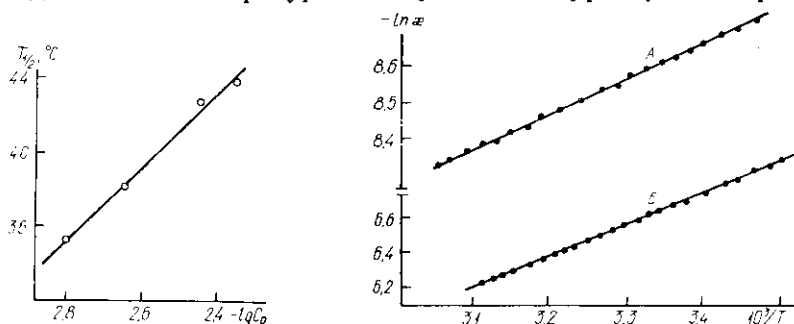


Рис. 2. Зависимость  $T_{1/2}$  от концентрации раствора Na-ДНК-I

Fig. 2.  $T_{1/2}$  versus the logarithm of Na-DNA-I concentration

Рис. 3. Зависимость удельной электропроводности от температуры: А — Na-ДНК-II ( $2,2 \cdot 10^{-3}$  М); Б — KCl (0,01 М)

Fig. 3. Arrhenius plot of  $\log \kappa$  as a function of  $10^3/T$ : А) Na-DNA-II ( $2,2 \cdot 10^{-3}$  М); Б) KCl ( $1,0 \cdot 10^{-3}$  М)

ДНК-II (рис. 3) не наблюдается ни одного излома во всем исследованном интервале температур. Хотя вторичная структура ДНК-II в растворах детально не изучена, есть основания полагать, что она существенно нарушена. Результаты, представленные на рис. 3, служат дополнительным тому доказательством.

Из рис. 1 видно также, что с ростом концентрации ДНК интервал температур, соответствующий участку *bc*, уменьшается с 23,5 до 18,7 °С. Это согласуется с уменьшением ширины перехода «спираль — клубок» в водных растворах ДНК при росте ее концентрации и с тем, что ширина перехода в бессолевых растворах существенно выше, чем в присутствии поддерживающего электролита [3].

Итак, как показано выше, на рис. 1 участок *cd* соответствует электропроводности нативной ДНК, *ab* — денатурированной, а в интервале *bc* имеет место процесс плавления ДНК.

Линейные зависимости, представленные на рис. 1, позволили по уравнению Аррениуса рассчитать энергии активации электропроводности ДНК. Оказывается, что независимо от концентрации исследуемого раствора величины  $E_a$  на участках *ab* и *cd* одинаковы и составляют  $16,4 \pm 1,1$  кДж/моль. Интересно, что  $E_a$  для денатурированной и нативной ДНК совпадают. Несмотря на то, что большой вклад в проводимость бессолевых растворов ДНК вносят противоионы (об этом свидетельствуют и близкие значения  $E_a$  солей ДНК и соответствующих противоионов, представленные в таблице), кажется неожиданным тот факт, что  $E_a$  не зависит от структуры полииона, особенно если учесть, что она зависит от природы катиона в ряду хлоридов щелочных металлов [1]. Близкие по величине значения энергии активации получены нами для денатурированных Li, Na,  $\text{NH}_4$ -солей ДНК-II (таблица).

Средняя величина  $E_a$ , рассчитанная для четырех участков *bc* (рис. 1), равна  $32,5 \pm 1,0$  кДж/моль. Исходя из того, что  $E_a$  нативной и денатурированной ДНК одинаковы, уместно предположить, что в интервале *bc*  $E_a$  имеет такое же значение. Поэтому величину  $E_a = 32,5$  кДж/моль нельзя считать энергией активации электропроводности

сти. Более высокую скорость изменения электропроводности с ростом температуры на этом участке по сравнению с участками *ab* и *cd* можно объяснить увеличением концентрации свободных противоионов в процессе денатурации ДНК.

Отметим, что энергия активации электропроводности водных растворов низкомолекулярных электролитов зависит от температуры только вблизи 0 °С, так как в этом интервале происходит перестройка структуры воды. В изученном нами интервале температур  $E_a$  для простых электролитов от температуры не зависит, о чем свидетельствует кривая *B* (рис. 3), отвечающая зависимости Аррениуса для 0,01 М раствора КСl. На ней нет ни одного излома.

Сравнение энергии активации электропроводности бессолевых растворов ДНК с энергией активации электропроводности соответствующих противоионов

Activation energy of conductivity of DNA in salt free solutions and corresponding counterions

Катион	$E_a^{MeДНК}$ , кДж/моль	$E_a^{Me}$ , кДж/моль
Li	17,38	15,83
Na	16,04	15,16
NH <sub>4</sub>	15,62	15,65

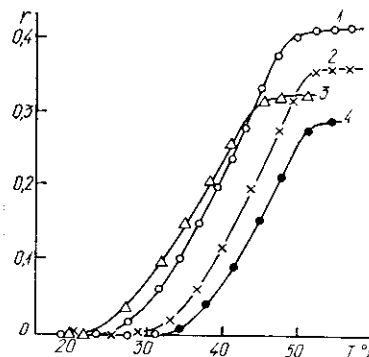


Рис. 4. Кривые плавления Na-ДНК-I в координатах  $r$  от  $T$ : 1— $2,21 \cdot 10^{-3}$ ; 2— $3,40 \cdot 10^{-3}$ ; 3— $1,48 \times 10^{-3}$ ; 4— $4,43 \cdot 10^{-3}$  М

Fig. 4. Melting curves of Na-DNA-I in coordinates  $r$  on  $T$ : 1— $2,21 \cdot 10^{-3}$ ; 2— $3,40 \cdot 10^{-3}$ ; 3— $1,48 \cdot 10^{-3}$ ; 4— $4,43 \cdot 10^{-3}$  М

Кондуктометрические кривые плавления позволили оценить долю освободившихся в процессе денатурации противоионов. Поскольку известно, что основной вклад в электропроводность вносят противоионы, можно считать, что смещение прямой *ab* относительно прямой *cd* по оси ординат (рис. 1) вызвано только увеличением числа свободных ионов Na<sup>+</sup>. Удельные электропроводности денатурированной и нативной ДНК можно записать в виде:

$$\kappa^H = \kappa_p^H + \kappa_{Na}^H; \quad (6)$$

$$\kappa^A = \kappa_p^A + \kappa_{Na}^A, \quad (6')$$

где  $\kappa_p^H$ ,  $\kappa_p^A$ ,  $\kappa_{Na}^H$ ,  $\kappa_{Na}^A$  — удельные электропроводности полииона и свободных противоионов для нативной и денатурированной ДНК соответственно. Если пренебречь изменением  $\kappa_p$  при денатурации, то из уравнений (6) и (6') следует:

$$\kappa_{cd} - \kappa_{bc} = \kappa_{Na}^A - \kappa_{Na}^H = \Delta C_{Na} \lambda_{Na} \cdot 10^{-3}, \quad (7)$$

где  $\Delta C_{Na}$  — увеличение концентрации свободных противоионов при денатурации;  $\lambda_{Na}$  — эквивалентная электропроводность ионов Na, рассчитанная по уравнению (3);  $\kappa_{bc}$  и  $\kappa_{cd}$  — удельные электропроводности, соответствующие пересечению линии  $1/T = \text{const}$  с прямой *bc* и продолжением прямой *cd* (рис. 1) соответственно.

Зависимость  $\lambda_{Na}$  от температуры вычисляли по уравнению:

$$\lambda_{Na}^T = \lambda_{Na}^{298} + A(T - 298) + B(T - 298)^2 + C(T - 298)^3, \quad (8)$$

где  $\lambda_{Na}^{298}$  и  $\lambda_{Na}^T$  — эквивалентные электропроводности ионов Na<sup>+</sup> при бесконечном разбавлении (298 К) и температуре  $T$  соответственно;  $A$ ,  $B$ ,  $C$  — константы [1].

На рис. 4 представлена зависимость доли освободившихся в ходе денатурации противоионов ( $r$ ) от температуры, где  $r = \Delta C_{Na} / C_p$ . Таким образом, показано, что кондуктометрический метод, характеризующий-

ся высокой точностью и простотой измерения, можно использовать для изучения полиэлектролитных свойств ДНК, в частности для получения кривых плавления ДНК в концентрированных бессолевых растворах.

Энергия активации электропроводности  $E_a$  одинакова для нативной и денатурированной ДНК. Поэтому можно считать, что она сохраняет неизменное значение и на участке *bc*. Избыточный наклон на этом участке по сравнению с наклоном, соответствующим  $E_a$ , дает величину энергии 16,1 кДж/моль, практически совпадающую с энтальпией денатурации ДНК в бессолевых растворах [3].

Однако, по-видимому, это случайное совпадение. Крутизна кривой плавления (в том числе и кондуктометрической) определяется не только энтальпией плавления, но и параметром кооперативности, значение которого для бессолевых растворов ДНК неизвестно.

В связи с этим представляется интересным получение кондуктометрических кривых плавления бессолевых растворов ДНК с различными величинами интервалов плавления, а также в присутствии добавок, мало влияющих на электропроводность системы, но существенно изменяющих энтальпию денатурации ДНК.

Авторы выражают глубокую благодарность В. И. Иванову за полезные советы при работе над статьей.

#### POLYELECTROLYTE PROPERTIES OF DNA: ACTIVATION ENERGY OF CONDUCTIVITY AND CONDUCTOMETRIC MELTING CURVES OF CONCENTRATED SALT-FREE SOLUTIONS

*I. A. Kuznetsov, N. V. Apolonnik, I. S. Shklover*

M. V. Lomonosov State University, Moscow

#### Summary

Three linear regions on the dependence of specific conductivity of native NaDNA on the temperature in the Arrhenius coordinates are found. These regions of conductometric curve are attributed to the conductivity of native, denatured DNA and to the intermediate structure. The activation energy ( $E_a$ ) independence on polyion structure is shown. The  $E_a$  values for native and denatured NaDNA are found to be equal to  $16.4 \pm 1.1$  kJ/mole. A share of counterions eliminating with denaturation is approximately evaluated. It is proposed to use conductometry for the obtaining of melting curves of DNA in the concentrated salt-free solutions.

1. Эрдей-Груз Т. Явление переноса в водных растворах.— М.: Мир, 1976.—595 с.
2. Premelting effects in DNA under salt-free conditions / H. Grassi, M. A. Rix-Montel, H. Kranck, D. Vasilescu // *Biopolymers*.— 1975.— 14, N 12.— P. 2525—2535.
3. Термическая денатурация ДНК в концентрированных бессолевых растворах: сопоставление микрокалориметрических и спектрофотометрических данных / А. А. Ахрем, В. Т. Андрианов, А. П. Власов и др.— *Молекуляр. биология*.— 1985.— 19, № 3.— С. 623—628.
4. Kuznetsov I. A., Apolonnik N. V. The equivalent conductivity of aqueous salt-free solutions of DNA. The influence of univalent counterions // *Biopolymers*.— 1981.— 20, N 10.— P. 2083—2091.
5. Спиринов А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // *Биохимия*.— 1958.— 23, № 3.— С. 656—662.
6. Кузнецов И. А., Филиппов С. М., Воронцова О. В. Зависимость электропроводности изопонных растворов ДНК от температуры. Расчет констант диссоциации первичных фосфатных групп // *Молекуляр. биология*.— 1979.— 13, № 3.— С. 543—549.
7. Королев Н. И. Влияние природы противоионов на состояние ДНК в концентрированных бессолевых системах: Автореф. дис. ... канд. хим. наук.— М., 1985.—17 с.
8. Mingot F. Quantitative test of Record's theory for proton-induced lowering of DNA melting temperature // *Biopolymers*.— 1981.— 20, N 10.— P. 2121—2136.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 10.02.86