



Структура и функция биополимеров

УДК 577.323.433:576.316.352:578.088.5

М. А. Шурдов, А. Д. Груздев

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА НА ЭНЕРГИЮ СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИИ ДНК *

Определена зависимость свободной энергии сверхспирализации $g \approx K\sigma^2$ от концентрации NaCl в растворе по измерениям изотерм связывания бромистого этидия с ДНК плазмиды рBR322. Показано, что с уменьшением концентрации соли от 0,3 до 0,01 М значение константы K возрастает более чем вдвое, а число сверхвитков заметно падает. Энергия сверхспирализации ДНК уменьшается приблизительно на 20 %.

Введение. Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о важной роли напряжений в сверхспирализованной ДНК при осуществлении основных генетических процессов — транскрипции, репликации и рекомбинации [1—3]. Сверхспирализованная ДНК обладает повышенной свободной энергией, которая может быть использована для образования неканонических структур (Z-форма, H-форма, «кресты»). Высказано предположение [5], что такие структуры, появляющиеся в напряженной ДНК, способны служить сайтами опознавания регуляторных белков. В работах [6, 7] обнаружено, что вероятности конформационных переходов в сверхспирализованной ДНК в неканонические формы заметно зависят от ионной силы раствора. Для анализа энергетических изменений при переходах необходимы сведения о влиянии ионной силы на энергию сверхспирализации ДНК.

Свободная энергия сверхспирализации (g), приходящаяся на пару оснований кольцевой молекулы ДНК, квадратично зависит от плотности сверхвитков (σ) [5]:

$$g/RT = K\sigma^2,$$

где K — константа, связанная с жесткостью ДНК. Общий характер зависимости числа сверхвитков от ионной силы раствора исследован достаточно полно [8, 9]. В то же время имеющиеся результаты измерения величины K не захватывают интервала низких ионных сил ($< 0,2$). Вызвано это прежде всего методическими трудностями. В частности, в методе равновесного распределения топоизомеров [10, 11, 13] необходима высокая активность релаксирующих ферментов, которая сильно падает в низкоконцентрированных солевых растворах. При спектрофотометрическом титровании сверхвитков ковалентно замкнутой ДНК бромистым этидием в области низких ионных сил заметно возрастают ошибки, вызванные увеличением доли слабосвязанного, не интеркалированного между основаниями и, следовательно, не титрующего сверхвитки ДНК красителя [14, 15].

В настоящей работе свободную энергию сверхспирализации ДНК определяли в растворах 0,01–0,3 М NaCl путем флюориметрического титрования сверхвитков бромистым этидием. Этот способ свободен от

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.

недостатков спектрофотометрического метода, поскольку слабосвязанный краситель не обладает повышенным квантовым выходом флуоресценции [14, 15].

Материалы и методы. Концентрацию бромистого этидия («Serva», ФРГ) в растворе определяли спектрофотометрически, принимая его молекулярную экстинкцию при 480 нм равной 5600.

Препарат кольцевой ДНК плазмиды *pBR322*, содержащей свыше 95 % сверхспирализованных молекул, получали по методу [16]; линейную ДНК — обрабатывая препараты рестриктазой *EcoRI*. При измерениях использовали буфер А (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА- Na_2 , рН 7,4) с добавлением требуемого количества NaCl.

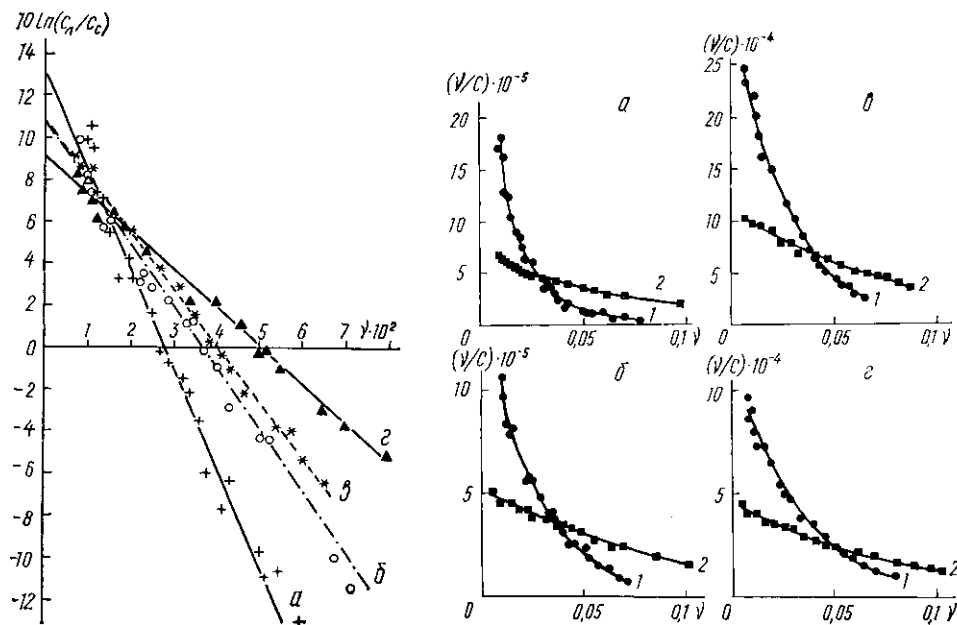


Рис. 1. Изотермы связывания бромистого этидия со сверхспирализованной (1) и линейной (2) ДНК плазмиды *pBR322* в буфере А с добавлением различного количества NaCl: а — 0,01; б — 0,03; в — 0,125; г — 0,3 М

Fig. 1. Scatchard plots for binding of EtBr to supercoiled (1) and relaxed (2) DNA molecules of plasmid *pBR322* in buffer A (1 mM EDTA — Na_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) with NaCl added: а — 0.01; б — 0.03; в — 0.125; г — 0.3 M

Рис. 2. Зависимости $\ln(C_n/C_c)$ от плотности посадки (v) красителя бромистого этидия на ДНК. C_n и C_c — концентрации свободного красителя в растворах сверхспирализованной и линейной ДНК соответственно. Прямые построены для ДНК в буфере А с добавлением различного количества NaCl: а — 0,01; б — 0,03; в — 0,125; г — 0,3 М

Fig. 2. Plots of $\ln(C_n/C_c)$ versus EtBr binding density v , C_n and C_c are free dye concentrations in solutions of relaxed and supercoiled DNA, respectively. Straight lines are determined for DNA in buffer A with different NaCl concentration added: а — 0.01; б — 0.03; в — 0.125; г — 0.3 M

Для определения количества интеркалированного красителя использовали флуориметрический метод [14, 15], измеряя интенсивность флуоресценции на спектрофлуориметре МРФ-44В. Его концентрацию (D_i) находим из соотношения

$$D_i/C_0 = (I - I_1)/(I_2 - I_1),$$

где C_0 — полная концентрация красителя в растворе; I — интенсивность флуоресценции измеряемого раствора; I_1 и I_2 — интенсивности флуоресценции калибровочных растворов. Первый и второй растворы содержали соответственно свободный и полностью связанный с ДНК красители в концентрации C_0 .

Концентрацию свободного красителя в растворе находим из соотношения $C = C_0 - D_i$. Строго говоря, $C = C_0 - D_i - D_e$, причем концентрацию слабосвязанного красителя D_e следует определять в отдельном эксперименте. Известно, однако, что в

растворах с концентрацией соли $\geq 0,01$ М NaCl и при низкой плотности посадки бромистого этидия на ДНК $D_e \leq 0,1 D_i$ [15]. В свою очередь, величину D_i можно достаточно снизить, если использовать разбавленные растворы ДНК. В наших экспериментах титровали растворы ДНК с $P \sim 10^{-7}$ М, для которых $D_i \leq 0,2 C$. В результате систематическая ошибка определения концентрации C не превышает 2 %.

Изотермы связывания бромистого этидия с ДНК строили в координатах Скэтчарда v/C и v , где $v = D_i/P$ (v — плотность посадки интеркалированного красителя в молях на моль нуклеотидов).

Результаты и обсуждение. Изотермы связывания красителя линейными и сверхспирализованными молекулами ДНК при различной ионной силе растворов представлены на рис. 1. Используя пары изотерм, измеренных при постоянной ионной силе раствора, нетрудно найти отношение концентраций C_n/C_c для обоих типов ДНК при одинаковой плотности посадки красителя и построить зависимость $\ln(C_n/C_c)$ от v . Как видно из рис. 2, экспериментальные данные хорошо описываются соотношением

$$\ln(C_n/C_c) = a(v_0 - v), \quad (1)$$

где v_0 — плотность посадки красителя, достаточная для компенсации имеющихся в ДНК сверхвитков. Как показано в работе [16],

$$\frac{d(g/2RT)}{dv} = \ln(C_n/C_c), \quad (2)$$

откуда $g/RT = a(v_0 - v)$ и при $v = 0$

$$g/RT = av_0^2 = K\sigma^2 \quad (3)$$

(здесь $\sigma = -1,44 v_0$ [26] и $K = a/(1,44)^2$). Результаты определения K из наклона кривых рис. 2, плотности сверхвитков ДНК из условия $\ln(C_n/C_c) = 0$ и, следовательно, свободной энергии сверхспирализации g (в единицах RT) представлены в таблице.

Значения K , найденные при ионных силах растворов $> 0,1$, практически совпадают с измеренными другими авторами в этом же диапазоне ионных сил и выше. Однако при более низких концентрациях соли обнаруживается значительный (\sim в 2 раза) рост K . Это обстоятельство достаточно для качественного объяснения результатов работы [6]. Исследуя В — Z-переходы вставки $(dG-dC)_{16}$ в ДНК плазмиды *pBR322*, авторы обнаружили падение критической плотности сверхвитков при уменьшении ионной силы раствора с 0,2 до 0,01 М NaCl. В случае постоянного значения K падение плотности сверхвитков означает уменьшение свободной энергии сверхспиральной ДНК, что требует изощренного и едва ли правдоподобного объяснения энергетики В — Z-перехода. Подобные трудности, по-видимому, исчезают, если учесть обнаруженный нами рост K .

Последнее заключение относится к роли размеров ионов в наблюдаемом эффекте. Сравнение двух последних строк таблицы указывает на очень слабое влияние больших трис-ионов. Следует, напротив, ожидать значительного влияния малых ионов (Mg^{2+} , Ca^{2+}) на свободную энергию сверхспирализации. В пользу этого предположения свидетель-

Параметры сверхспирализованной ДНК плазмиды pBR322 в буфере А при различных концентрациях соли

Parameters of supercoiled pBR322 DNA in buffer A with NaCl added

NaCl, М	K	$-\sigma$	g/RT
0,3	$8,86 \pm 0,21$	$0,0501 \pm 0,0010$	$2,22 \pm 0,10$
0,125	$13,00 \pm 0,42$	$0,0404 \pm 0,0017$	$2,12 \pm 0,19$
0,03	$14,14 \pm 0,77$	$0,0369 \pm 0,0021$	$1,93 \pm 0,24$
0,01	$22,08 \pm 0,70$	$0,0286 \pm 0,0011$	$1,81 \pm 0,15$
0,01 + 0,04 М трис-НСl	$17,99 \pm 1,04$	$0,0315 \pm 0,0019$	$1,79 \pm 0,38$

ствуют результаты работ [11, 13]. Поэтому эффекты двухвалентных катионов заслуживают специального изучения.

В заключение попытаемся представить причину наблюдавшегося роста свободной энергии сверхспирализованной ковалентно замкнутой ДНК в разбавленном солевом растворе. Этот эффект едва ли связан с изменением крутильной или даже изгибной жесткости молекул, явно входящих в формулы упрощенной теории [17]. Дело в том, что ни крутильная [18], ни изгибная жесткости ДНК [19] не меняются в исследованном диапазоне ионных сил растворов. В то же время существенно (\sim в 4 раза) изменяется эффективный диаметр [20—22] молекулы. Поэтому мы полагаем, что влияние ионной силы на энергию сверхспирализации аналогично влиянию отношения длины кольцевой молекулы к ее диаметру. Имеющиеся экспериментальные данные о росте K с уменьшением размера плазмидной ДНК [23, 24] свидетельствуют в пользу высказанного предположения.

Авторы признательны О. Ф. Борисовой за критические замечания по методике работы и А. В. Вологодскому за предложенное объяснение наблюдавшегося эффекта. Авторы благодарны также Ю. С. Лазуркину, М. Д. Франк-Каменецкому, А. В. Лукашину и Ю. Л. Любченко за полезное обсуждение результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грагеров А. И., Миркин С. М. Влияние сверхспирализации ДНК на основные генетические процессы у прокариот // Молекуляр. биология.— 1980.—14, № 1.— С. 8—34.
2. Kmiec E. B., Worcel A. The positive transcription factor of the 5S RNA gene induced a 5S DNA-specific gyration in *Xenopus* oocyte extracts // Cell.— 1985.—41, N 3.— P. 945—953.
3. Fisher M. L. DNA supercoiling and gene expression // Nature.— 1984.—307, N 5932.— P. 686—687.
4. Лазуркин Ю. С. ДНК: сверхспирализация и образование неканонических структур // Биополимеры и клетка.— 1986.—2, № 6.— С. 283—292.
5. Wang J. C., Peck L. J., Becherer K. DNA supercoiling and its effects on DNA structure and function // Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.— 1983.—43.— P. 85—91.
6. Singleton C. K. Effect of salts, temperature, and stem length on supercoil-induced formation of cruciforms // J. Biol. Chem.— 1983.—258, N 12.— P. 7661—7668.
7. Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions / C. K. Singleton, J. Klysik, S. M. Stirdivant, R. D. Wells // Nature.— 1982.—299, N 5881.— P. 312—316.
8. Hinton D. M., Bode V. C. Ethidium binding affinity of circular deoxyribonucleic acid determined fluorometrically. The effect of NaCl concentration on supercoiling // J. Biol. Chem.— 1975.—250, N 3.— P. 1061—1070.
9. Upholt W. B., Gray H. B., Vinograd J. J. Sedimentation velocity behaviour of closed circular SV40 DNA as a function of superhelix density, ionic strength, counterion and temperature // J. Mol. Biol.— 1971.—62, N 1.— P. 21—38.
10. Action of nicking-closing enzyme on supercoiled and nonsupercoiled closed circular DNA: formation of a Boltzmann distribution of topological isomers / D. E. Pulleyblank, M. Shure, D. Tang et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1975.—72, N 11.— P. 4280—4284.
11. Depew R. E., Wang J. C. Conformational fluctuations of DNA helix // Ibid.— P. 4275—4279.
12. Bauer W., Vinograd J. The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. 2. The free energy of superhelix formation in SV40 DNA // J. Mol. Biol.— 1970.—47, N 4.— P. 419—435.
13. Lee C. H., Mizusawa H., Kakejuda T. Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.—78, N 5.— P. 2838—2842.
14. Le Pecq I.-B., Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization // J. Mol. Biol.— 1967.—27, N 1.— P. 87—106.
15. Сравнение пространственной организации РНК фага MS2 и 16S РНК. Взаимодействие с красителями, специфичными ко вторичной структуре нативной РНК и после гидролиза ее нуклеазой SI / О. Ф. Борисова, В. В. Гречко, Н. В. Кузнецова и др. // Молекуляр. биология.— 1987.—21, № 2.— С. 515—528.
16. Hsieh T.-S., Wang J. C. Thermodynamic properties of superhelical DNAs // Biochemistry.— 1975.—14, N 3.— P. 527—535.
17. Sen S., Majumdar R. Thermodynamics of B—Z transition in supercoiled DNA // Nucl. Acids Res.— 1987.—15, N 14.— P. 5863—5871.

18. Millar D. P., Robbins R. J., Zewail A. H. Torsion and bending of nucleic acids studied by subnanosecond time-resolved fluorescence depolarization of intercalated dyes // J. Chem. Phys.—1982.—76, N 4.—P. 2080—2094.
19. Hagerman P. J. Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence // Biopolymers.—1981.—20, N 7.—P. 1503—1535.
20. Ярмола Е. Г., Зарудная М. И., Лазуркин Ю. С. Зависимость осмотического давления ДНК и эффективного диаметра от ионной силы // Биофизика.—1986.—31, № 2.—С. 338—339.
21. Strigter D. Interactions of highly charged colloidal cylinders with applications to double-stranded DNA // Biopolymers.—1977.—16, N 7.—P. 1435—1448.
22. Brian A. A., Frisch H. L., Lerman L. S. Thermodynamics and equilibrium sedimentation analysis of the close approach of DNA molecules and a molecular ordering transition // Ibid.—1981.—20, N 6.—P. 1305—1328.
23. Shore D., Baldwin R. L. Energetics of DNA twisting. 2. Topoisomer analysis // J. Mol. Biol.—1983.—170, N 4.—P. 983—1007.
24. Horowitz D. S., Wang J. C. The torsional rigidity of DNA and the length dependence of the free energy of DNA supercoiling // Ibid.—1984.—173, N 1.—P. 75—91.
25. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—542 p.
26. Wang J. C. The degree of unwinding of the helix by ethidium // J. Mol. Biol.—1974.—89, N 4.—P. 783—801.

Ин-т цитологии и генетики
Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 12.01.88

EFFECT OF THE IONIC SOLUTION STRENGTH ON ENERGY OF DNA SUPERCOILING

M. A. Shurlov, A. D. Gruzdev

Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

Binding isotherms of EtBr to supercoiled and relaxed *pBR322* DNA were used to determine dependence of the free energy of DNA supercoiling $g \sim K\sigma^2$ on NaCl concentration in the solution. It is shown that a decrease of concentration from 0.3 M to 0.01 M NaCl makes the value of K constant more than doubled and promote a significant reduction of the superhelical density $-\sigma$. The free energy of DNA supercoiling decreases approximately by 20 per cent.

УДК 577.323

Н. И. Речкунова, С. Г. Лохов, Ю. А. Горбунов, В. В. Зиновьев,
Я. И. Бурьянов, Э. Г. Малыгин

СТАБИЛЬНОСТЬ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ СУБСТРАТОВ. ЭФФЕКТ ДНК-МЕТИЛАЗЫ ECODAM*

Исследована стабильность олигонуклеотидных комплексов, содержащих различные дефекты в участке узнавания метилазы *Ecodam*. Одноцепочечный 20-членный олигонуклеотид, содержащий в центре самокомплементарную гексануклеотидную последовательность, образует частично дуплексную структуру только при температуре ниже 5°C. Остальные комплексы плавятся в узком интервале температур 22—31°C в 30 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,8. В присутствии метилазы *Ecodam* наблюдается увеличение температуры плавления комплекса по крайней мере на 5°C.

Введение. Адениновая ДНК-метилаза *Ecodam* узнает симметричную тетра-нуклеотидную последовательность

$$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \text{---} \text{A} \text{---} \text{T} \text{---} \text{C} \dots \\ \dots \text{C} \text{---} \text{T} \text{---} \text{A} \text{---} \text{G} \dots 5' \end{array}$$

Принятые обозначения: MeS — метильная группировка; префикс d в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.