

ВЛИЯНИЕ АНИОНОВ CO_3^{2-} И HCO_3^- НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

И. А. Капуцкая

Нейтральные соли сильно влияют на стабильность двойной спирали ДНК. Прежде всего это относится к катионам, которые, начиная с очень малых концентраций, резко увеличивают стабильность (температуру плавления, T_m) двойной спирали ДНК, когда к ее раствору добавляются соли щелочных (K^+ , Na^+ , Li^+) или щелочноземельных (Mg^{2+} , Ca^{2+}) металлов.

Однако при очень высоких концентрациях солей (более 1 М) на величину стабильности двойной спирали влияют в первую очередь анионы. Разница действия катионов при этом мала. Среди анионов имеются ярко выраженные стабилизаторы (SO_4^{2-}) и дестабилизаторы (ClO_4^-) двойной спирали. Ион Cl^- является сравнительно нейтральным.

До настоящего времени влияние ионов, образующихся при растворении в воде Na_2CO_3 , на стабильность ДНК не изучалось. Вместе с тем растворы Na_2CO_3 широко используются при работе с белками и нуклеиновыми кислотами. Поэтому необходимо провести детальное исследование влияния анионов HCO_3^- и CO_3^{2-} на стабильность двойной спирали ДНК.

Цели исследования

- Изучить влияние различных концентраций Na_2CO_3 на стабильность двойной спирали ДНК путем регистрации кривых плавления спектрофотометрическим и микрокалориметрическим методами.
- Выявить раздельное влияние ионов Na^+ , HCO_3^- и CO_3^{2-} , а также рН среды на стабильность двойной спирали ДНК.
- Установить нижнюю концентрационную границу влияния HCO_3^- и CO_3^{2-} на стабильность двойной спирали.

Методом спектрофотометрии исследовалась стабильность двойной спирали ДНК в растворах Na_2CO_3 различной концентрации.

Зависимость T_m от молярной концентрации Na_2CO_3 представлена на рис. 1. Она имеет сложный характер. Чтобы выяснить причины, обуславливающие такую форму кривой, было рассмотрено три фактора, влияющие на стабильность ДНК в растворе Na_2CO_3 .

- При увеличении концентрации Na_2CO_3 в растворе растет концентрация ионов Na^+ , что оказывает стабилизирующее влияние на двойную спираль ДНК благодаря экранированию отрицательного заряда фосфатных групп.

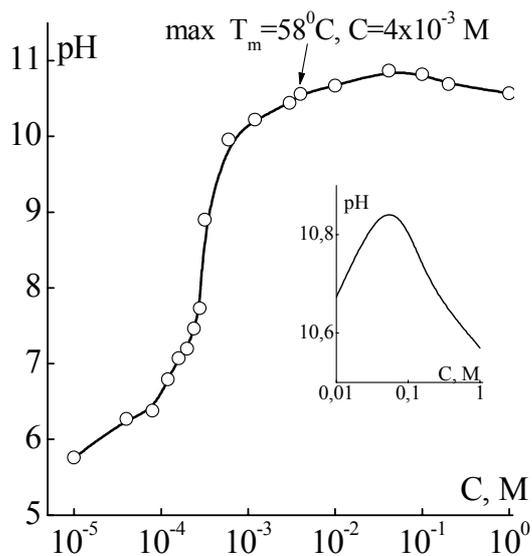


Рис. 1. Зависимость рН от молярной концентрации Na_2CO_3

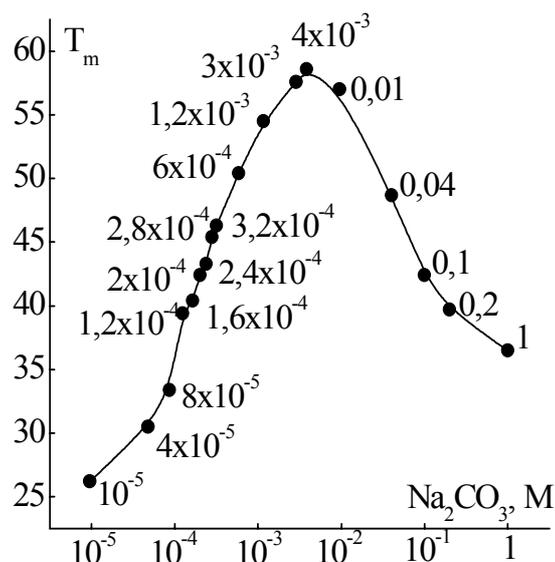


Рис. 2. Зависимость температуры плавления ДНК (T_m) от молярной концентрации Na_2CO_3 . Во всех образцах содержится $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ЭДТА, чтобы удалить из раствора ионы двухвалентных металлов (Mg^{2+}), которые сильно стабилизируют двойную спираль ДНК при низких концентрациях Na_2CO_3 и искажают результаты исследований. На рисунке указаны молярные концентрации Na_2CO_3 . Концентрация ДНК 0,05 мг/мл

- При увеличении концентрации Na_2CO_3 от 10^{-5} до $4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ растет рН раствора от 5,7 до 10,8 (рис. 2). Повышение рН до 7÷8 слегка стабилизирует двойную спираль ДНК, однако дальнейший рост рН вызывает ее дестабилизацию.

- Анионы CO_3^{2-} и HCO_3^- также могут влиять на стабильность двойной спирали.

Из рис. 2 следует, что главную роль в дестабилизации ДНК может играть резкое повышение рН с ростом концентрации Na_2CO_3 . Рост рН прекращается при концентрации Na_2CO_3 , равной $4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, а затем рН начинает слегка уменьшаться. Однако температура плавления ДНК продолжает резко падать, несмотря на это снижение рН. Этот результат позволяет предположить, что дестабилизация вызвана не только ростом рН, но и дестабилизирующим влиянием анионов HCO_3^- и CO_3^{2-} на двойную спираль ДНК.

Чтобы проверить это, были получены зависимости температуры плавления ДНК от рН в растворах, содержащих 0,1 M Na_2CO_3 и $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Na_2CO_3 , 0,2 M NaCl , где концентрация Na^+ одинаковая и соответствует физиологической. рН растворов варьировали путем добавления

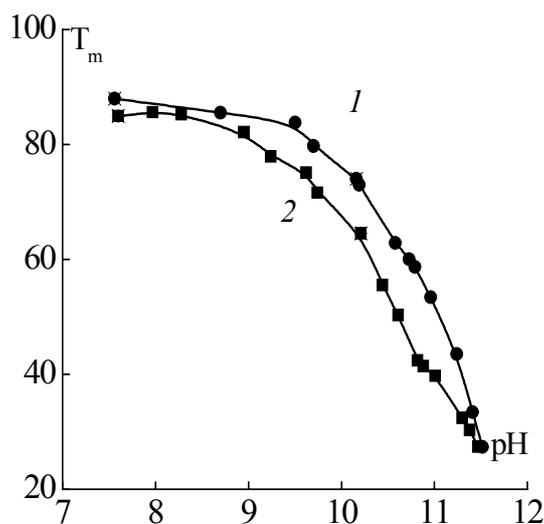


Рис. 3. Зависимости температуры плавления от pH в 0,2 М NaCl (1) и 0,1 М Na_2CO_3 (2). Звездочками обозначены точки, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии

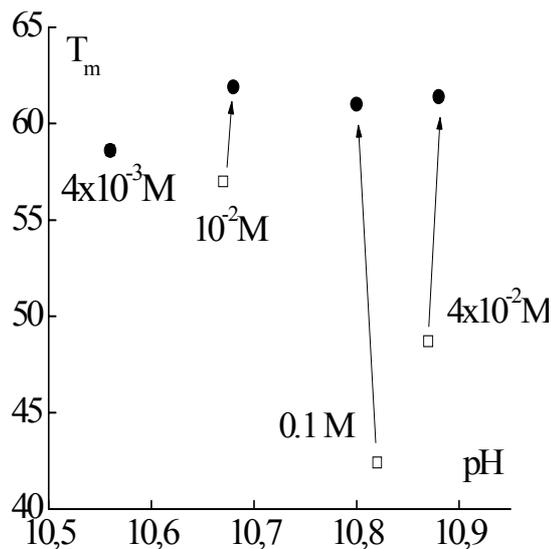


Рис. 4. Иллюстрация дестабилизирующего действия малых концентраций анионов HCO_3^- и CO_3^{2-} на двойную спираль ДНК.

1) Точки зависимости $T_m(\text{pH})$ для случая, когда pH и концентрация Na^+ изменяется в результате увеличения концентрации Na_2CO_3 (зависимость 1, \square). Концентрации Na_2CO_3 указаны на рисунке. 2) Точки зависимости $T_m(\text{pH})$ в среде, содержащей 4×10^{-3} М Na_2CO_3 и количество ионов Na^+ , введенных путем добавления NaCl, соответствующее зависимости 1 (зависимость 2, \bullet). pH, соответствующее зависимости 1 получали путем добавления NaOH. Соответствующие точки зависимостей 1 и 2 соединены стрелками

NaCl для снижения pH или NaOH для увеличения pH. Оказалось, что температура плавления ДНК в растворе с большей концентрацией Na_2CO_3 на 5–12 °С ниже, чем с меньшей концентрацией (рис. 3).

Обычно дестабилизирующий (или стабилизирующий) эффект анионов начинает проявляться при гораздо более высоких концентрациях (~1 М). Было исследовано влияние на стабильность двойной спирали ДНК различных концентраций Na_2CO_3 из интервала $4 \cdot 10^{-3} - 10^{-1}$ М в сравнении с концентрацией $4 \cdot 10^{-3}$ М Na_2CO_3 . Результаты этих экспериментов представлены на рис. 4, из которого видно, что дестабилизирующий эффект возникает при концентрации Na_2CO_3 , равной $4 \cdot 10^{-3}$ М.

Таким образом, выявлено дестабилизирующее действие на двойную спираль ДНК анионов HCO_3^- и CO_3^{2-} , начиная с концентраций $\sim 10^{-3}$ М. Разработана методика, позволяющая разделить воздействие на двойную спираль кислотности среды, которая изменяется в присут-

ствии Na_2CO_3 , ионов Na^+ и анионов HCO_3^- и CO_3^{2-} . Показано, что любые концентрации Na_2CO_3 , используемые в настоящее время в различных методиках выделения, анализа и очистки ДНК, не вызывают нарушения стабильности двойной спирали при комнатных и более низких температурах. Однако при температуре, превышающей 30°C , такие нарушения могут иметь место.

Работа поддерживалась БФФИ, грант Б02М-091.

ОСОБЕННОСТИ РАССЕЯНИЯ ЧАСТИЦ НА ДАЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ПОТЕНЦИАЛАХ

П. Б. Кац

Как известно, сечение рассеяния на кулоновском потенциале в квантовой и классической механике получают формулу Резерфорда

$$d\sigma = (\alpha/2mv^2)^2 \frac{d\Omega}{\text{Sin}^4 \frac{\theta}{2}}. \quad (1)$$

Полное сечение рассеяния, рассчитанное по формуле (1), окажется бесконечным. При этом точные собственные волновые функции рассеянной частицы не имеют особенностей.

Причина расходимости в том, что для получения формулы (1) используют асимптотический вид точной волновой функции

$$\psi \approx ce^{ikz} + \frac{f(\theta)}{r} e^{ikr}. \quad (2)$$

Эта асимптотика применима вплоть до очень малых, но не бесконечно малых углов рассеяния [1].

Углы рассеяния, для которых формула Резерфорда неприменима, соответствуют очень большим «прицельным расстояниям», на которых кулоновский потенциал экранируется, если рассеяние происходит на нейтральных атомах (см., например, [2], стр.87). Однако при исследовании рассеяния на пучках эта проблема становится актуальной.

В работе [3] была рассмотрена временная теория рассеяния частиц на дальнедействующем потенциале в рамках теории возмущений. Предполагалось, что в момент времени $t = 0$ вблизи точки $(0,0,-z)$ образовался волновой пакет, описывающий рассматриваемую частицу.

В некоторый момент t рассматриваемый пакет в разложении по собственным функциям оператора Гамильтона будет иметь следующий вид: