УДК 541.64; 620.186

КОНДЕНСАЦИЯ ДНК Т4 В ВОДНО-СПИРТОВЫХ СРЕДАХ

© 2000 г. М. О. Галлямов, О. А. Пышкина, В. Г. Сергеев, И. В. Яминский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.11.99 г.

Процесс компактизации высокомолекулярной ДНК Т4 исследован в водно-спиртовой среде методом АСМ. Получены АСМ-изображения компактных глобул, образованных молекулами ДНК в водно-спиртовых средах. Обнаружено, что при 40–50% концентрациях спирта молекулы ДНК формируют частично компактированные образования, в которых отдельные витки макромолекулы закручиваются в тороидальные структуры. С привлечением методики восстановления истинных геометрических параметров объекта по АСМ-профилю, показано, что в состав глобулы входит одна молекула ДНК. Предложена модель упаковки ДНК в процессе компактизации.

ВВЕДЕНИЕ

Было показано [1], что гигантская ДНК Т4 в водно-спиртовой смеси при концентрации спирта более 50% (для изопропанола) претерпевает конформационный переход клубок–глобула. При уменьшении концентрации спирта до 40% наблюдалось частичное разворачивание глобул. Однако в силу ограничения разрешающей способности, используемого метода флуоресцентной микроскопии (классический предел $\lambda/2$), оказалось трудным определить микроструктуру объектов.

Метод сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) может успешно применяться для исследования конформации и микроструктуры молекул ДНК [2, 3]. Традиционная схема приготовления образцов для зондовой микроскопии на воздухе включает процедуру высушивания капли препарата на поверхности твердой подложки. Процесс высушивания является неравновесным и сопровождается трудно контролируемыми изменениями локальных значений концентрации препарата, что может привести к сложности при интерпретации результатов. Исключить процедуру высушивания в схеме СЗМ-эксперимента можно при проведении исследований в жидкости (с использованием жидкостной ячейки).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовали ДНК бактериофага Т4 (Nippone Gen). При проведении экспериментов использовали бидистиллированную деионизованную воду. Водно-спиртовые среды готовили с использованием изопропанола (химически чистого).

Исследования конденсации молекул ДНК проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) непосредственно в водно-спиртовой смеси, с использованием подложек слюды. Свежий скол слюды и зонд АСМ помещали в жидкостную ячейку, которую последовательно заполняли используемыми растворами. Препарат, содержащий молекулы ДНК Т4 в водно-спиртовой смеси при 80% концентрации спирта, получали смешивая один объем раствора ДНК в 0.5 ТВЕ-буфере с четырьмя объемами изопропанола. Препарат молекул ДНК в 40% изопропаноле получали смешивая два объема раствора ДНК в буфере с тремя объемами изопропанола. В обоих случаях конечная концентрация ДНК в смеси составляла $1 \times \times 10^{-6}$ моль. Иммобилизация исследуемых структур на подложке осуществлялась за счет адсорбции из раствора.

Эксперименты проводили в жидкостной ячейки АСМ Nanoscope-III (Digital Instruments, USA) в режиме прерывистого контакта с использованием заостренных кантилеверов из нитрида кремния (Nanoprobe) жесткостью 0.32 Н/м.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Препарат, содержащий молекулы ДНК Т4, в водно-спиртовой смеси при 80% концентрации изопропанола, вводили в жидкостную ячейку, заполненную предварительно водно-спиртовой смесью с той же концентрацией спирта. При этих условиях макромолекулы ДНК осаждались на поверхностью слюды в виде компактных глобул (рис. 1а, 2а).

Применение методики восстановления реальных размеров исследуемых объектов (учет эффекта уширения) [4] позволяет определить объем и геометрию глобулярных структур по трем известным параметрам: высоте АСМ-изображения над подложкой, ширине на полувысоте АСМ-профиля (для эллипсоида следует использовать два значения ширины, соответствующие направлениям главный осей) и радиусу кривизны иглы.

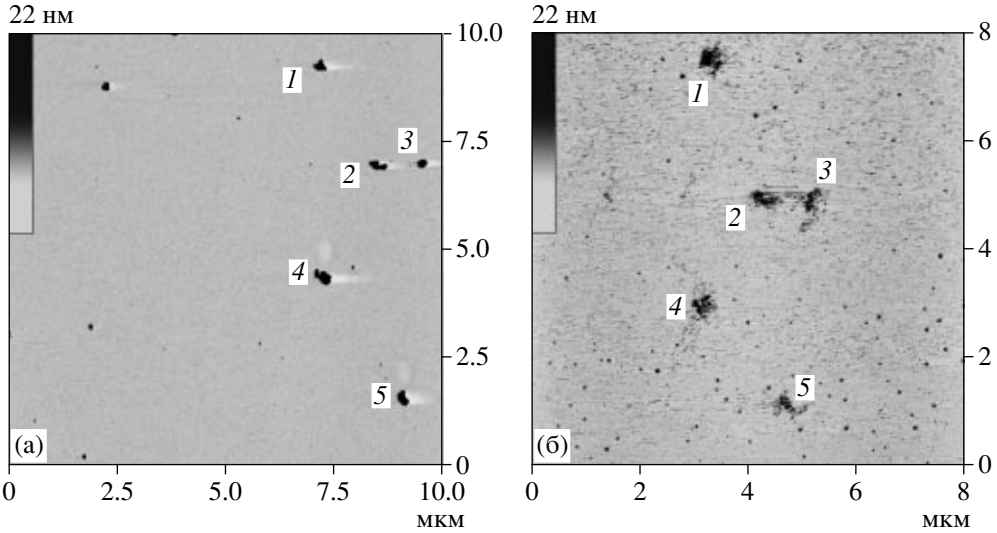

Рис. 1. АСМ-изображение компактных глобул, сформированных молекулами ДНК: а–в 80% изопропаноле, б – после понижения концентрации спирта до 40–50%.

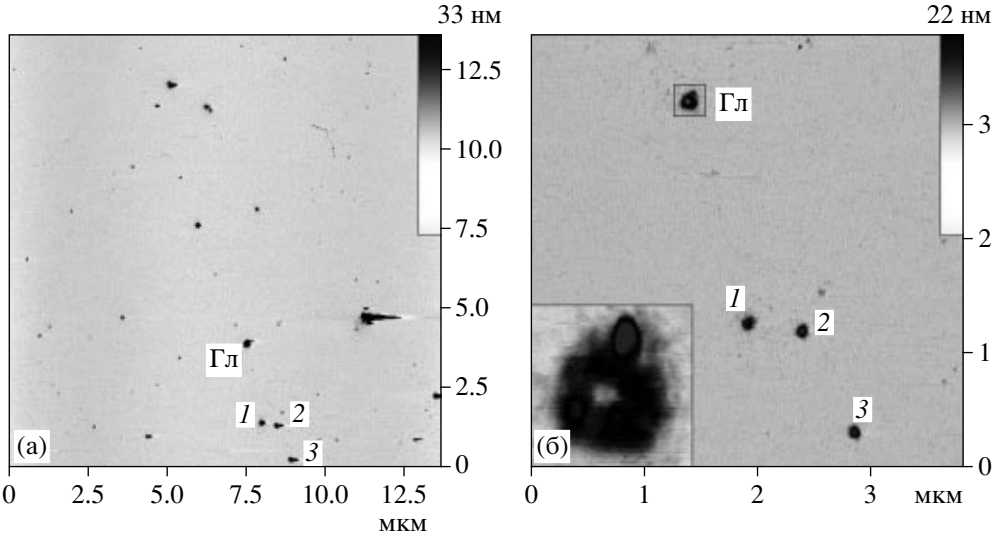

Рис. 2. АСМ-изображение компактных глобул, сформированных молекулами ДНК: а – в 80% изопропаноле, б – после понижения концентрации спирта до 40–50%. Врезка – одна из глобул с бóльшим разрешением.

Мы провели расчеты для двух значений радиуса кривизны иглы: 5 и 10 нм. По нашим оценкам с применением тест-объектов радиус используемой иглы лежит в указанном интервале (таблица).

Значения параметров глобулы, определенные с использованием двух граничных значений для радиуса кривизны иглы, близки (с учетом значительной величины стандартного отклонения, что обусловлено статистическим разбросом анализируемых параметров для различных глобул). Восстановленные значения параметров полуосей a и b позволяют сделать вывод, что геометрической формой глобулы является сплюснутый и слегка вытянутый эллипсоид.

Из таблицы следует, что объем глобулы составляет $(2.5 \pm 1.7) \times 10^5$ нм^3, что превышает объем молекулы ДНК Т4 1.7×10^5 нм^3 ($L = 55 \times 10^3$ нм). Таким образом можно предположить, что каждая глобула образована одной молекулой ДНК, нахо-

Геометрические параметры глобул, образованных молекулами ДНК Т4 в результате компактизации спиртом

R, нм	a, нм	b, нм	c, нм	V, 10^5 нм^3
5	41 ± 12	55 ± 17	23 ± 9	2.5 ± 1.7
10	37 ± 12	52 ± 17	23 ± 9	2.1 ± 1.5

Обозначения: a, b, c, V – параметры эллипсоида, c – половина высоты АСМ-изображения глобулы.

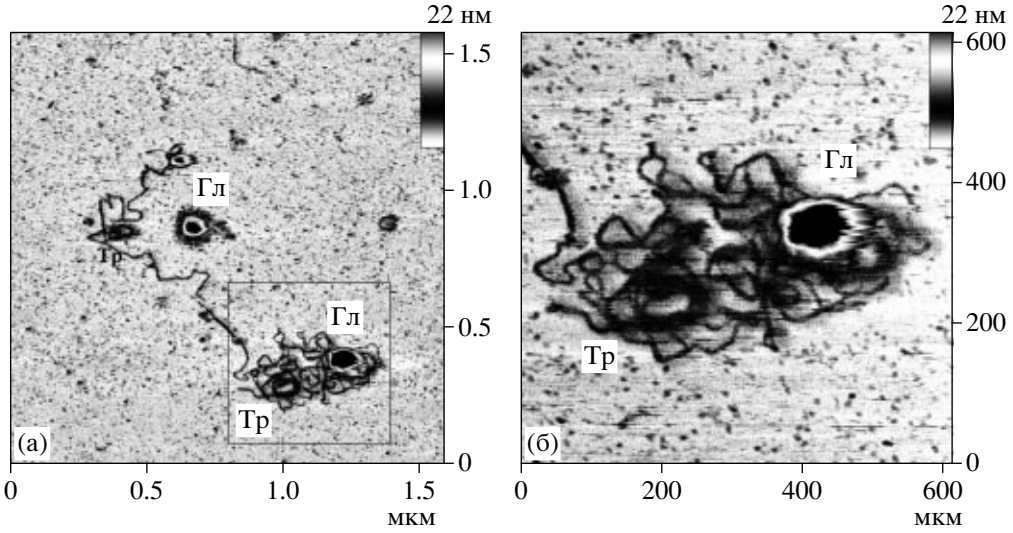

Рис. 3. Частично компактизованные молекулы ДНК, сформированные и визуализованные в жидкостной ячейке АСМ при повышении концентрации изопропанола (от 40%). Отмечены глобулярные (Гл) и тороидальные (Тр) образования. Рис. б с бóльшим разрешением, чем а.

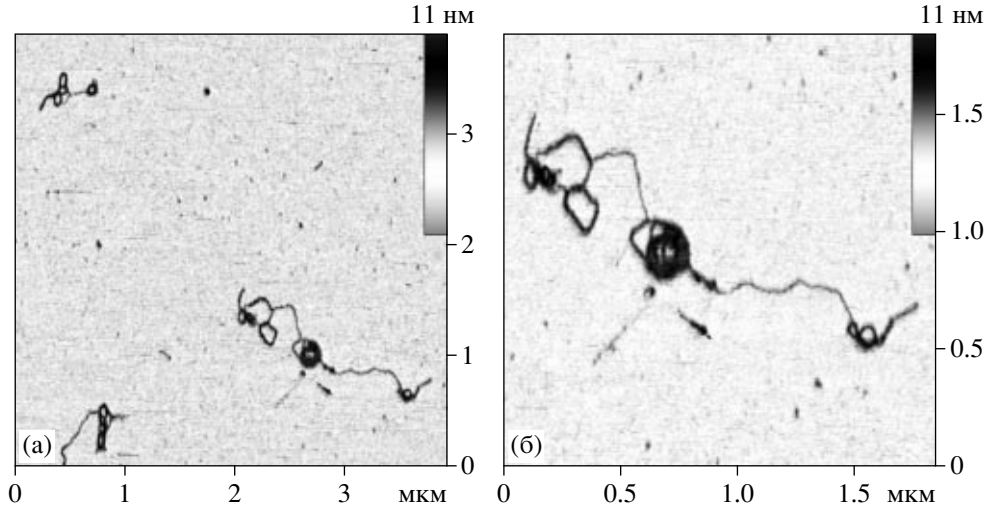

Рис. 4. Частично компактизованные молекулы ДНК, сформированные и визуализованные в жидкостной ячейке АСМ при повышении концентрации изопропанола (от 40%). Рис. б с бóльшим разрешением, чем а.

дящейся в достаточно плотноупакованном состоянии.

Для исследования частично декомпактизованных структур макромолекул ДНК Т4 в жидкостную ячейку, содержащую ДНК Т4 в виде глобул в 80% изопропаноле (20% воды), добавляли смесь изопропанола с водой (40% изопропанола + 60% воды).

Из рис. 2а (отметка “Гл”) видно, что при 80% изопропанола частицы ДНК представляют собой компактные глобулы. При прокачивании через ячейку 40% раствора изопропанола начинается динамический процесс декомпактизации – глобулы уменьшаются по высоте и в некоторых из них (рис. 2б, врезка) проявляется центральная полость. Однако оказалось, что дальнейшего процесса разворачивания глобул не происходит. Это можно объяснить наличием сил взаимодействия между молекулой и подложкой, которые препятствуют разворачиванию при уменьшении концентрации спирта. Поэтому макромолекулы ДНК в промежуточном состоянии (между глобулой и клубком) получали следующим образом.

Молекулы ДНК, находящиеся в 40% изопропаноле, вводили в жидкостную ячейку, а затем концентрацию спирта в ячейке повышали прокачиванием 80% изопропанола. При этом молекулы выпадали на поверхность подложки в частично компактизованном состоянии. Дальнейшая компактизация ДНК, адсорбированных на под-

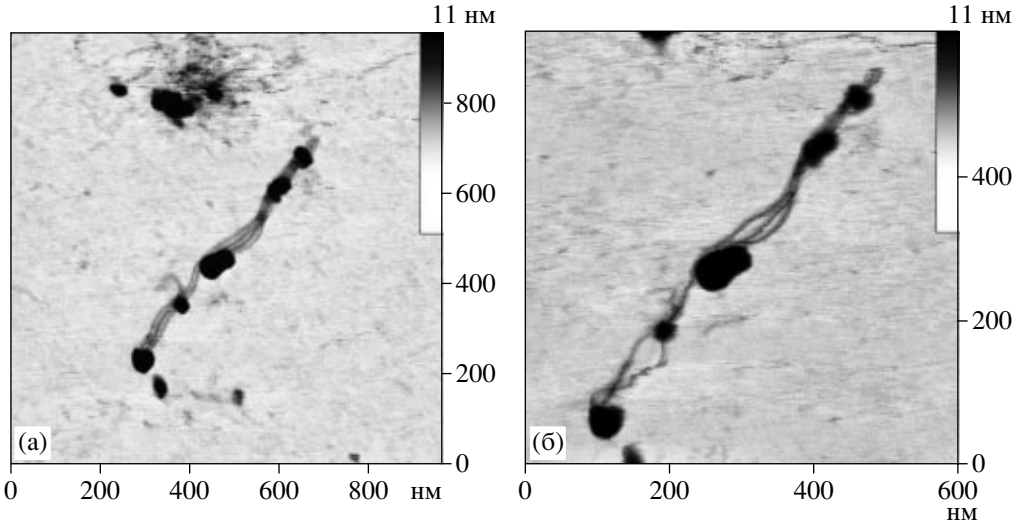

Рис. 5. Стержневая структура: а – образованная в результате компактизации молекулы ДНК; б – частично "расплетенная" под воздействием зонда микроскопа после нескольких сканирований.

ложку, не наблюдалась, что, по-видимому, объясняется взаимодействием молекул ДНК со слюдой.

АСМ-изображения частично компактизованных структур приведены на рис. 3 и 4. Обнаружено, что начальным процессом компактизации глобул является закручивание отдельных участков макромолекулы ДНК в тороидальные структуры, которые, по-видимому, являются центрами дальнейшей компактизации.

На основании наблюдений можно предположить, что компактные глобулы (рис. 1а, 2а) являются продуктом компактизации макромолекул ДНК и представляют собой частицы высокой плотности, в которых отдельные участки молекулы закручены в тороидальные структуры. В центре компактной частицы, возможно, имеется полость: объем глобулы несколько превышает объем одной молекулы ДНК Т4, и частично декомпактизованные глобулы позволяют визуализовать центральную полость (рис. 2б, врезка).

Следует отметить, что макромолекулы ДНК при повышении концентрации спирта в ячейке (от 40%) образуют не только тороидальные, но и (реже) стрежнеобразные структуры (рис. 5). Процесс сканирования приводит к тому, что стержневая структура частично "расплетается" под воздействием зонда. Наблюдение в ряде случаев компактизованных структур, имеющих морфологию, отличную от тороидальной, может объясняться тем, что в эксперименте исследовались промежуточные стадии процесса компактизации, в которых некоторое количество молекул может находиться в нестационарных (неравновесных) морфологических состояниях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной программы "Университеты России – фундаментальные исследования" (проект № 5060) и РФФИ (грант № 97-03-32778а).

СПИСО К ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sergeyev V.G., Mikhailenko S.V., Pyshkina O.A. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 1780.
2. *Sergeyev V.G., Pyshkina O.A., Gallyamov M.O. et al.* // Progr. Colloid. Polym. Sci. 1997. V. 106. P. 198.
3. *Галлямов М.О., Пышкина О.А., Сергеев В.Г., Яминский И.В.* // Поверхность. 1998. № 2. С. 79.
4. *Галлямов М.О., Яминский И.В.* // Поверхность. 2000. № 7. С. 63.

T4 DNA Condensation in Water-Alcohol Media

M. O. Gallyamov, O. A. Pyshkina, V. G. Sergeyev, I. V. Yaminsky

The process of compaction of high molecular weight DNA T4 is investigated directly in a AFM liquid cell. The AFM-images of globules formed by DNA molecules in the result of compaction in water-alcohol environments at high izopropanol concentration (80%) are received; it is found that at intermediate concentration of izopropanol (40–50%) the DNA molecules form partially compacted formations in which the separate coils of macromolecules twist in toroidal structures. It is shown using the technique of deconvolution of the AFM-images that the globule include only one closely packed DNA molecule. The model of DNA packing is proposed on the basis of AFM experiment.