

индекс 3624



ЕРЕВАНСКИЙ ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

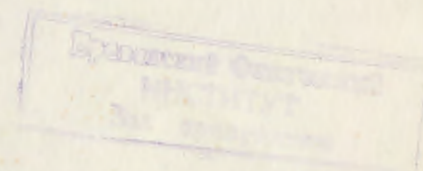
Препринт ЕФИ-1105(68)-88

ԵՐԵՎԱՆԻ ՖԻԶԻԿԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ  
ЕРЕВАНСКИЙ ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
YEREVAN PHYSICS INSTITUTE

---

С.Г.ГЕВОРКЯН

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ  
В ПЛЕНКАХ ДНК



ЦНИИАтоминформ  
ЕРЕВАН—1988

Ս.Գ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

ԻՄԵՐ ՄԵՐՈՍՏՐԻՍՏԱՑԻՆ ՓԱՐԱՑԻՆ ԱՆՅՈՒՄՆԵՐ ԴՆԹ-Ի ՔՎԿԱՆՔՆԵՐՈՒՄ

100-300<sup>0</sup>Կ շերտատիմանային տիրույթում չափվել են ԴՆԹ-ի ափորժ  
Չափմանը Թուլեի դիմադրի մոդուլը և մարման լոգարիթմական դե-  
կրեմենտը 240-160<sup>0</sup>Կ շերտատիմանային տիրույթում հայտնաբերվել է  
կարգավորվածություն-ոչ կարգավորվածություն տիպի Փազային անցում,  
որը ուղեկցվում է Թուլեի մոդուլի մի քանի կարգի աճով: Մարման  
լոգարիթմական դեկրեմենտը Փազային անցման տիրույթում ունի մի քանի  
մեքսիմում, ինչը վկայում է արտկազոյացման արդի ըսրդ ուղեքսացիոն  
գործընթացների մասին, որոնք տեղի են ունենում ԴՆԹ-ի Բաղանթներում:  
Ուսումնասիրվել է այդ գործընթացի կախումը Բաղանթում շրի պարու-  
նակությունից և ԴՆԹ-ի մոլեկուլների կոնֆորմացիոն վիճակից:

Երևանի ֆիզիկայի ինստիտուտ

Երևան 1988

S.G. GEVORKIAN

LOW-TEMPERATURE PHASE TRANSITIONS IN DNA FILMS

Young's dynamical modulus E and the logarithmic decrement  
of damping of amorphous films of DNA are studied in the tem-  
perature range from 100 to 300<sup>0</sup>K. A phase transition of an  
order-disorder type is discovered in the temperature range  
from 240 to 160<sup>0</sup>K which is accompanied by a several orders of  
magnitude increase in the Young's modulus. The logarithmic  
decrement of damping has several maxima in the range of phase  
transition, which testifies to relaxation processes like glass  
transition. The dependence of this transition on the hydration  
level and conformation state of DNA are studied.

Yerevan Physics Institute

Yerevan 1988

С.Г.ГЕВОРКЯН

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ  
В ПЛЕНКАХ ДНК

Измерены динамический модуль Юнга ( $E$ ) и логарифмический декремент затухания  $\hat{\nu}$  аморфных пленок ДНК в температурном интервале 100–300°K. Обнаружен фазовый переход типа порядок-беспорядок в области температур 240–160°K, который сопровождается увеличением модуля Юнга на несколько порядков. Логарифмический декремент затухания в области фазового перехода имеет несколько максимумов, что свидетельствует о сложных релаксационных процессах типа стеклования, происходящих в пленках ДНК. Изучена зависимость этого перехода от содержания воды в пленках и от конформационного состояния молекул ДНК.

Ереванский физический институт  
Ереван 1988

Механические свойства могут дать информацию не только об упругих силах внутри образца, но и о процессах, связанных с молекулярным движением при релаксации механических напряжений в твердом образце. Хорошо известно, что исследование механических свойств ряда полимеров в широком температурном и частотном интервалах позволило обнаружить широкий спектр релаксационных движений как основной полимерной цепи, так и боковых групп [1–3]. Исследование частотных и температурных зависимостей механических свойств белков обнаружило явление низкотемпературного стеклования в поверхностных слоях молекул белков [4,5]

Исследование релаксационных процессов в биополимерах имеет особое значение [8], так как функциональные способности этих молекул тесно связаны с динамическими свойствами, т.е. со способностью двигаться, флюктуировать около положения равновесия [6,7].

Разными физическими методами решали эту проблему для ДНК: дифракцией тепловых нейтронов на ориентированных волокнах [9], низкочастотной раман-спектроскопией [10,11], бриллуэновским рассеянием [12,13], деполяризацией флуоресценции с субнано-

секундным разрешением [14]. Эти методы изучают ДНК, видя динамику через определенное частотное "окно". Раман-спектроскопия - на частотах  $\pm 50 \text{ см}^{-1}$  (сотни гигагерц), брилленовское рассеяние - десятки гигагерц, рассеяние тепловых нейтронов - несколько терагерц. Правда, в работе [9] делается попытка аппроксимировать полученные данные к нулевым частотам, но правомерность такой аппроксимации не очевидна. В работе [15] делалось предположение, что на этих частотах изучению реальной динамики ДНК будет мешать то обстоятельство, что вязкоупругие свойства ДНК зависят от частоты возмущения, т.е. ответ системы на внешнее периодическое возмущение зависит от частоты возмущения. Это подтвердилось в работе [16], где показана частотная зависимость вязкости гидратной воды.

Целью настоящей работы является исследование вязкоупругих свойств пленок ДНК в широком температурном интервале (100-300°K) на частотах, ниже собственных (50-20000 Гц). Изучая механические свойства ДНК на низких частотах можно достоверно сказать, что у воды не будут свойства твердого тела, а низкотемпературные эксперименты помогут обнаружить особенности спектра релаксации на низких частотах.

#### Материалы и методы

Была исследована ДНК оленевки крупного рогатого скота. Молекулярный вес  $\sim 10^9$ . Содержание  $\text{NaCl}$  - до 2% по весу. Содержание балков - до 1% по весу. Пленки готовились на тефлоновых подложках. Насыщенный водный раствор ДНК (гель) медленно

сушился на подложке при температуре 10°С. Денатурированные образцы готовились многократным кипячением раствора ДНК.

Определенная относительная влажность в камере создавалась: от 97-32% относительной влажности (ОВ) - растворами разной концентрации  $\text{CaCl}_2$ , 15 и 10% ОВ - насыщенными растворами  $\text{ZnCl}_2$  и  $\text{LiCl}$ , соответственно.

Для измерения динамического модуля Юнга (E) и логарифмического декремента затухания ( $\nu$ ) был использован микрометод Морозова В.Н. [17]. Метод основан на анализе возбуждаемых электрически поперечных резонансных колебаний консольно закрепленных пластинок. Модификация метода, которая позволяет измерить E и  $\nu$  в широком температурном интервале, описана в [5, 18].

Метод измерения гидратации микрообразцов весом до 0,01 мг описан в [19].

#### Результаты и обсуждение

Пленки ДНК можно рассмотреть как композиционный материал, состоящий из молекул ДНК и гидратной воды с небольшим содержанием соли ( $\sim 2\% \text{ NaCl}$ ). Поэтому, исследуя низкотемпературные механические свойства пленок, надо знать в каком количестве  $\text{H}_2\text{O}$  имеется в каждом отдельном эксперименте. Были исследованы изотермы гидратации ДНК в разном состоянии: нативной, денатурированной в твердой фазе и денатурированной в растворе. На рис. 1 приведены изотермы гидратации (о них более подробно см [20]). В этой работе эти данные нужны как контрольные. Известно, что в зависимости от содержания гидратной воды в пленках или волок-

нах ДНК может находиться в разных конформационных состояниях. Таким образом, изменение содержания  $H_2O$  в пленках - удобный инструмент для экспериментальных исследований.

На рис.2 приведены зависимости модуля Юнга ( $E$ ) от температуры нативных пленок ДНК. Предварительно при  $t = 25^\circ C$  ( $298^\circ K$ ) в пленках содержание воды  $h$  было:  $h = 0,8$  г  $H_2O$ /г.сух.в.ДНК ( $A = 91\%$  ОВ),  $h = 0,5$  г  $H_2O$ /г.сух.в.ДНК ( $A = 85\%$  ОВ) и  $h = 0,2$  г  $H_2O$ /г.сух.в.ДНК ( $A = 32\%$  ОВ). Как видно, при содержании воды  $h \geq 0,5$  г  $H_2O$ /г.сух.в.ДНК в области температур  $240-160^\circ K$  наблюдается сильное увеличение модуля Юнга. При таком содержании  $H_2O$  молекулы ДНК находятся в так называемой А-форме (см. напр. [21]). Уменьшение содержания воды приводит к тому, что этот переход постепенно исчезает, при низких  $h$  превращаясь в прямую (см.рис.2). При уменьшении  $h$  вся кривая смещается в область высоких температур. Аналогичные низкотемпературные переходы наблюдаются на кристаллах и пленках белков [5], только по температуре перехода они ближе к высоким температурам. При содержании воды  $h = 0,2$  г.  $H_2O$ /г сух.в.ДНК этот переход исчезает, хотя в белках при таком содержании воды переход наблюдается.

Логарифмический декремент затухания пропорционален внутреннему трению в твердом образце (см.рис.3). У образцов с высоким содержанием воды в области перехода  $\psi$  имеет ярко выраженные пики: один - при температуре  $235^\circ K$ , другой -  $218^\circ K$ . Такая зависимость модуля Юнга ( $E$ ) и логарифмического декремента затухания  $\psi$  характерна для процесса стеклования [5,1]. Достоверно можно сказать, что в области температур

$240-160^\circ K$  в пленках ДНК происходит процесс стеклования. Судя по тому, что у  $\psi$  как минимум два пика, стеклование происходит отдельно в двух компонентах (это не обязательно составляющие части системы - отдельно вода и ДНК). На рис.3 показано, что уменьшение содержания воды приводит к исчезновению одного из пиков (при  $T = 235^\circ K$ ), в то время как другой фактически не меняется и исчезает при малых  $h$ . Интересно, что замерзание (или плавление при нагревании) свободной воды при температурах около  $273^\circ K$ , которое наблюдают калориметрически [22,23] для системы ДНК+ $H_2O$ , в данном эксперименте вкладает в значение модуля не дает, и только небольшое изменение  $\psi$  свидетельствует о наличии почти свободной воды. Это говорит о том, что свободная вода в пленках ДНК при замерзании не образует единую, цельную систему, которая увеличила бы жесткость пленки. Что относится к пику при  $T = 218^\circ K$ , то для выяснения его принадлежности были проведены эксперименты с денатурированной ДНК. Это позволило, не меняя энергетического состояния воды в пленке, поменять структуру молекул ДНК. На рис.4 приведены зависимости  $E$  и  $\psi$  денатурированной темплом ДНК от температуры при разном содержании воды. Как и в случае нативной ДНК, здесь также наблюдается процесс стеклования, температура перехода которого смещена в область высоких на  $\sim 3^\circ$ . При температурах около  $100^\circ K$  модуль денатурированных пленок примерно в 2 раза больше нативных. В денатурированных пленках при содержании воды  $h = 0,2$  г  $H_2O$ /сух.в.ДНК все еще наблюдается процесс стеклования. Сравнивая это с поведением нативной пленки ДНК при таком же содержании воды, можно предположить, что процесс стеклова-

ния относится не только к гидратной воде, но и к молекулам ДНК. На это указывает также зависимость  $\nu$  денатурированных пленок от температуры (рис.5). Наличие двух пиков свидетельствует о том, что при большом содержании воды процесс стеклования происходит в двух отдельных компонентах. Пик при температуре  $T = 235^{\circ}\text{K}$  у денатурированных также исчезает с уменьшением содержания воды в образцах, и вероятно при этой температуре стеклует гидратная вода. Другой пик тут смещен по температуре на  $6^{\circ}$  в сторону низких температур (по сравнению с нативной пленкой). Этот пик исчезает при малых содержаниях воды ( $h < 0,1$  г  $\text{H}_2\text{O}$ /г сух. в.ДНК), когда молекулы денатурированной ДНК, которые находятся в состоянии глобулы [23], сильно зажаты соседними молекулами.

Фазовый переход, который наблюдается в ДНК при низких температурах с помощью раман-спектроскопии [11], смещен в сторону высоких температур на  $\sim 30^{\circ}$ . Это тоже указывает на то, что мы имеем дело с процессом стеклования, так как раман-спектроскопия следит за "вибрацией" спирали ДНК на частотах в сотни гигагерц, что на много порядков выше, чем в данном методе. Такое смещение температуры стеклования в зависимости от частоты наблюдалось в полимерах [1,2] и в белках [5].

Таким образом, можно сказать, что в пленках ДНК при низких температурах происходит процесс стеклования, который выражается в многократном увеличении модуля Юнга пленок с уменьшением температуры ( $S$ -образная кривая) и в появлении ярко выраженных максимумов  $\nu$ , что типично для стеклующихся полиме-

ров [11]. Разнесенность по температуре пиков  $\nu$  и исчезновение одного из них с уменьшением содержания воды указывает на то, что один из них (при  $T = 235^{\circ}\text{K}$ ) соответствует гидратной воде. Смещение по температуре другого пика у денатурированных пленок указывает на то, что этот пик соответствует процессу стеклования ДНК (может быть вместе с хорошо связанной водой).

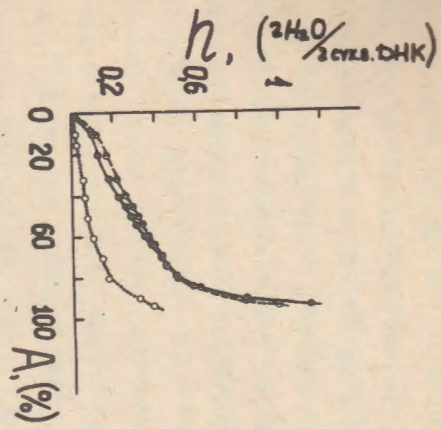


Рис. 1

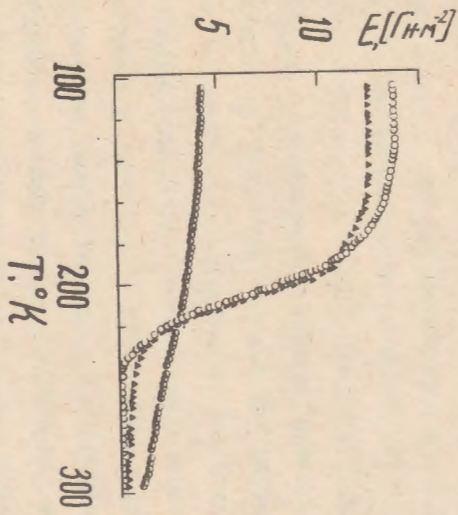


Рис. 2

10

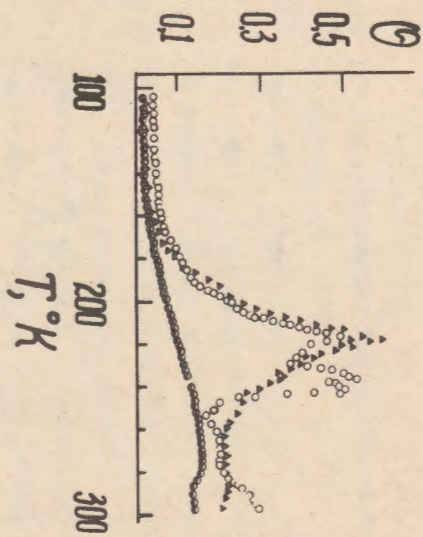


Рис. 3

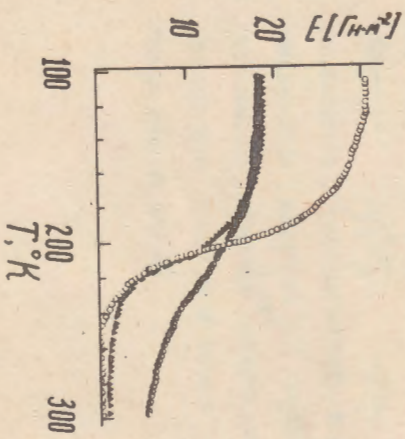


Рис. 4

11

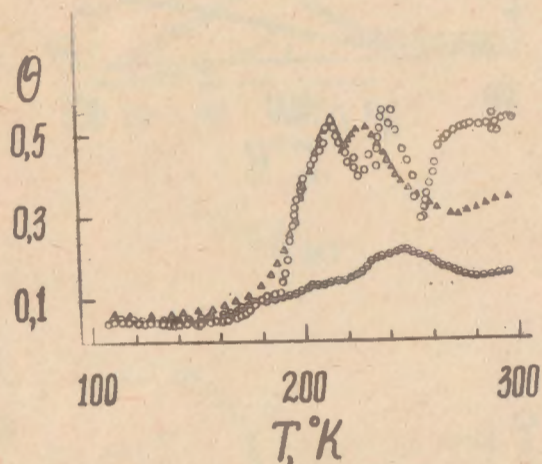


Рис. 5

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рис. 1 Изотермы гидратации ДНК селезенки крупного рогатого скота при  $t = 25^{\circ}\text{C}$

- нативная
- ◐—◐ денатурированная в твердой фазе
- денатурированная в растворе

Рис. 2 Зависимость модуля Юнга (E) от температуры: нативная ДНК, разные уровни гидратации

- $A = 91\%$ ,  $= 0,8\text{г H}_2\text{O/г.сух.в.ДНК}$
- ▲—▲  $A = 85\%$ ,  $= 0,5\text{г H}_2\text{O/г.сух.в.ДНК}$
- ◐—◐  $A = 32\%$ ,  $= 0,06\text{г H}_2\text{O/г.сух.в.ДНК}$

Рис. 3 Зависимость модуля Юнга (E) от температуры: денатурированная в растворе ДНК, разные уровни гидратации

- $A = 97\%$ ,  $= 0,38\text{г H}_2\text{O/г.сух.в.ДНК}$
- ▲—▲  $A = 85\%$ ,  $= 0,22\text{г H}_2\text{O/г.сух.в.ДНК}$
- ◐—◐  $B = 32\%$ ,  $= 0,06\text{г H}_2\text{O/г.сух.в.ДНК}$

Рис. 4 Зависимость логарифмического декремента затухания от температуры: нативная ДНК (обозначения как на рис. 2)

Рис. 5 Зависимость логарифмического декремента затухания от температуры: денатурированная в растворе ДНК (обозначения как на рис. 3)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferry T.D. *Viscoelastic Properties of Polymers*, Wiley - Interscience, N.Y., 1961.
2. Hopkins J.L., Kurkjian C.R. In *Physical Acoustics, Principles and Methods*, vol.2, Part B, Mason W.P., Ed., Academic, N.Y., 1965, p.110-192.
3. Перепечко И.И. Свойства полимеров при низких температурах. М.: Химия, 1977, с.171-196.
4. Геворкян С.Г., Морозов В.Н. Акустические свойства агрегированных белковых систем в широком температурном диапазоне. Тезисы докладов симпозиума: Акустические свойства биологических объектов. Пушкино, 1984, с.21-22.
5. Morozov V.N., Gevorkian S.G. *Low-Temperature Glass Transition in Proteins*, *Biopolymers*, 1985, vol.24, pp 1785-1799.
6. Blow D.M. *Hard Facts on Structure: Hot Air About Mobility*, *Nature*, 1982, vol.297, N.5866, pp 454-455.
7. Koshland D.E.Jr. *Role of Flexibility in the Specificity, Control and Evaluation enzymes*. *FEBS Lett.*, 1976, vol.62, p.847-852.
8. Абатуров Л.В. Тепловое движение белка: мелкомасштабные флуктуации и конформационные подсистемы. *Молекулярная биология*, 1983, т.17, № 4, с.663-704.
9. Grimm H., Stiller H., Majkrzak C.F. *Observation of Acoustic Umklapp Phonons in Water-Stabilized DNA by Neutron Scattering*. *Phys.Rev.Lett.*, 1987, vol.59, p.1780-1783.
10. Urabe H., Tomminaga Y., Kubota K. *Experimental Evidence of Collective Vibrations in DNA Double Helix (Raman spectroscopy)*. *J.Chem. Phys.*, 1983, 78(10), pp.5937-5939.
11. Tomimaga Y., Shida M., Kubota K. et al. *Coupled dynamics Between DNA Double Helix and Hydrated Water by Low Frequency Raman Spectroscopy*, *J.Chem.Phys.*, 1985, 83(11), pp 5972-5975.
12. Hakim M.B., Lindsay S.M., Powell J. *The Speed of Sound in DNA*, *Biopolymers*, 1984, vol.23, pp 1185-1192.
13. Tao N.J., Lindsay S.M., Rupprecht A. *The Dynamics of the DNA Hydration Shell at Gigahertz Frequencies*, *Biopolymers*, 1987, vol.26, N.2, p.171-188.
14. Miller D.P., Robbins R.J., Zewail A.H. *Torsion and Bending of Nucleic Acids Studied by Subnanosecond Time-Resolved Fluorescence Depolarisation of Intercalated Dyes*. *J. Chem. Phys.*, 1982, 76(4), pp.2080-2094.
15. Геворкян С.Г., Худавердян Э.Э. Зависимость вязкоупругих свойств пленок ДНК от гидратации. *Биологический журнал Армении*, 1987, т.40, № 3, с.184-187.
16. Van Zandt L.L. *Resonant Microwave Absorption by Dissolved DNA*, *Phys.Rev.Lett.*, 1986, vol.57, N.6, pp.2085-2087.

17. Morozov V.N., Morozova T.Ya. Viscoelastic Properties of Proteins Crystals: Triclinic Crystals of Energy White Lysozyme in Different Conditions. *Biopolymers*, 1981, vol. 20, n.3, p.451-467.
18. Морозов В.Н., Геворкян С.Г. Измерение вязкоупругих свойств кристаллов белков при низких температурах. *Биологический журнал Армении*, 1986: т.39, № 3, с.203-207.
19. Геворкян С.Г., Морозов В.Н. Зависимость изотермы гидратации белков от способа упаковки в монокристалле. *Биофизика*, 1983, т.28, с.944-948.
20. Худавердян Э.Э., Геворкян С.Г. Влияние тепловой денатурации на гидратацию и вязкоупругие свойства пленок ДНК. *Биологический журнал Армении*, 1988, № 4, с.341-345.
21. Fuller W., Mahendrasingam A. X-Ray Fibre Diffraction Studies of DNA: Recent Results and Future Possibilities, In: *Topics in Nuclear Acid Structure*, 1987, pp.101-131.
22. Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул, 1979, т.128, № 2, с.273,-312.
23. Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул. Тбилиси: "Мецниереба" 1984, с.188.

Рукопись поступила 10 июня 1988 г.

С.Г.ГЕВОРКЯН

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ПЛЕНКАХ ДНК

Редактор Л.П.Мукаян

Технический редактор А.С.Абрамян

---

Подписано в печать 21/УП-88г. ВФ-03250 Формат 60x84/16  
 Офсетная печать. Уч.изд.л.0,8 Тираж 299 экз.Ц.10 к.  
 Зак.тип.№ 375 Индекс 3624

---

Отпечатано в Ереванском физическом институте  
 Ереван 36, ул.Братъев Алиханян, 2