1971 г. Ноябрь

Том 105, вып. 3

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

536.7

ПЕРЕХОД СПИРАЛЬ – КЛУБОК В ДНК

А. А. Веденов, А. М. Дыхне, М. Д. Франк-Каменецкий

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Введение	79
п.	Экспериментальные данные	32
Ш.	Переход спираль — клубок в гомополимерах	36
IV.	Переход спираль — клубок в гетерополимерах	96
v.	Заключение	13
Циті	грованная литература	17

«Мы полагаем, что ген или, может быть, целое хромосомное волокно представляет собой апериодическое твердое тело.»

Эрвин Шрёдингер «Что такое жизньсточки зрения физики?» (М., ИЛ, 1947, стр. 88)

І. ВВЕДЕНИЕ

Известно, что генетическая информация, включающая полный план построения живого организма, закодирована в последовательности мономерных звеньев гигантской молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Структура ДНК изображена на рис. 1. Молекула ДНК представляет собой комплекс из двух полимерных цепочек, связанных между собой межмолекулярными силами. Каждая цепочка в комплексе образует правую спираль (точнее, винтовую линию) и состоит из сахаро-фосфатного «хребта» с присоединенными к нему азотистыми основаниями четырех сортов — аденина (А), гуанина (Г), тимина (Т) и цитозина (Ц). Повторяющийся элемент цепочки (азотистое основание + сахар + фосфат) называется нуклеотидом. Таким образом, ДНК состоит из двух закрученных друг относительно друга полинуклеотидных цепочек. Существенно, что если связи между нуклеотидами внутри каждой из цепочек являются жесткими, ковалентными, имеющими энергию около 60 ккал/моль (3 эв), то связи между полинуклеотидными цепочками по крайней мере на порядок слабее. Имеется строгое правило комплементарности (соответствия) этих цепочек. Именно, всегда против аденина находится тимин, а против гуанина цитозин. Комплементарность определяется стерическим соответствием оснований. При этом комплементарные пары оснований стабилизированы как водородными связями (изображенными на рис. 1 пунктиром), так и просто электростатическими и лондоновскими силами. Существенное значение в стабильности ДНК имеет взаимодействие между соседними парами оснований в двойной спирали. Параметры структуры ДНК следующие: диаметр молекулы ≈ 20 Å, расстояние между соседними парами оснований ≈ 3.4 Å, на виток спирали приходится 10 пар оснований, так что соседние пары повернуты друг относительно друга на 36°

(см. примечание 1 в конце статьи). ДНК, как правило, состоит из 10⁴— 10⁵ звеньев (см. примечание 2). Таким образом, макромолекула ДНК представляет собой одномерное апериодическое твердое тело (кристалл). Это твердое тело является одномерным потому, что каждая элементарная



Рис. 1. Структура ДНК.

а) Отрезок одиночной полинуклеотидной цепи: слева — схематическое изображение (Φ — фосфат, C — сахар (дезоксирибоза), O_1 , O_2 и т. д. — различные азотистые основания), справа — химическое строение (атомы углерода в дезоксирибозном кольце и в азотистых основаниях, а также атомы водорода при углеродных атомах оснований не изображены); б) приближеные параметры двойной спирали ДНК в *B*-форме; е) соединение водородными связями (пунктир) комплементарных оснований.

ячейка (пара оснований) взаимодействует лишь с двумя соседними ячейками (координационное число равно 2). Апериодическим кристалл ДНК является потому, что состоит из последовательности элементарных ячеек двух сортов — пар нуклеотидов АТ и ГЦ. Эта последовательность не может быть периодической, подобно тому как не является периодической последовательность букв в осмысленном тексте книги, так как в порядке следования нуклеотидов заключена генетическая информация.

Исследование, как экспериментальное, так и теоретическое, свойств такого одномерного апериодического кристалла представляет несомненный интерес для физики. Физические исследования важны также для понимания генетических функций ДНК, которые заключаются в хранении, воспроизведении и реализации генетической информации (см. примечание 3).

Особое место среди физических процессов, происходящих с ДНК, занимает сравнительно хорошо изученный процесс плавления молекулы



Рис. 2. Схематическое изображение перехода спираль — клубок в ДНК. а) Полностью спиральное состояние (низкая температура); б) частично расплавленное состояние (температура в области перехода); с) полностью расплавленное состояние с разошедшимися нитями.

ДНК, называемый переходом спираль — клубок. Схематически переход спираль — клубок изображен на рис. 2. Однонитевая ДНК, образующаяся при переходе спираль — клубок, представляет собой гибкую полимерную цепь. Как сахаро-фосфатный остов, так и азотистые основания приобретают большую свободу вращения относительно ординарных связей. Статистический сегмент однонитевой молекулы (расстояние между звеньями в однонитевой ДНК равно 6,8 Å) составляет около 7 звеньев (см. примечание 4). Это значит, что однонитевый полинуклеотид в растворе ведет себя как цепь из свободно сочлененных сегментов, содержащих по 7 нуклеотидов. Такая цепь имеет гауссово распределение расстояний между концами и называется гауссовым или статистическим клубком. Различные состояния гауссовой цепи эквивалентны траекториям броуновской частицы, имеющей длину пробега, равную длине сегмента.

Переход спираль — клубок обратим. При охлаждении комплементарные цепочки вновь завязывают между собой водородные связи. При этом расстояние между основаниями вдоль сахаро-фосфатной цепи равно по-прежнему 6,8 Å. В то же время энергетически выгодным является непосредственный ван-дер-ваальсов контакт между соседними парами оснований, который соответствует расстоянию 3,4 Å. Для сближения на это расстояние соседним парам оснований необходимо повернуться друг относительно друга на 36° . Это требование диктуется стереохимией сахаро-фосфатного остова, причем поворот происходит таким образом, что всегда образуется правая спираль ДНК. В спиральном состоянии ДНК обладает весьма жесткой структурой. Свобода вращения вокруг ординарных связей почти полностью исключается. Все же некоторая гибкость цепи сохраняется, и двунитевая ДНК представляет собой клубок с аномально больщим статистическим сегментом приблизительно в 300 пар оснований. Такая величина статистического сегмента обусловлена непрерывной гибкостью спирали, а не локальными нарушениями спиральной структуры, т. е. ДНК представляет собой червеобразную (персистентную), а не зигзагообразную цепь (см. примечание 4). Таким образом, переход спираль — клубок представляет собой обратимый переход из энергетически выгодного высокоупорядоченного спирального, «кристаллического» состояния в разупорядоченное, «жидкое» состояние статистического клубка. Существенно подчеркнуть, что последовательность оснований в цепи остается в клубке столь же строго фиксированной, как и в спирали, так как при плавлении ДНК разрушаются лишь слабые межмолекулярные силы, ковалетные связи внутри сахаро-фосфатных ценей остаются нетронутыми. Вопрос об обратимости перехода спираль клубок осложнен тем, что после полного расхождения нитей взаимный поиск комплементарных участков затруднен и включаются кинетические факторы, так что на опыте часто наблюдается гистерезис. Гистерезиса, однако, удается избежать, не доведя процесс плавления спирали до конца, чтобы нити оставались сцепленными друг с другом в нескольких точках.

Настоящий обзор посвящен термодинамической теории перехода спираль — клубок в ДНК. Однако, прежде чем переходить к изложению теории, приведем, очень кратко, основные экспериментальные данные, привлечение которых необходимо как для выбора теоретической модели, так и для постановки вопросов, на которые должна ответить теория.

II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Переход спираль — клубок можно наблюдать различными методами: оптическими (поглощение, оптическая активность), микрокалориметрическим и т. д. Наибольшее распространение получил метод измерения поглощения раствора ДНК в ближней ультрафиолетовой области (в районе 2600 Å), основанный на гиперхромном эффекте — увеличении поглощения ДНК при переходе спираль — клубок (см., например, ¹). Это увеличение поглощения происходит вследствие исчезновения взаимодействия соседних цар оснований при переходе. Если D — оптическая плотность раствора, D_{\min} и D_{\max} – ее значения, отвечающие полностью спиральному и полностью клубкообразному состояниям ДНК, то вели- $D - D_{\min}$ дает долю звеньев 1 — ϑ , находящихся в клубкообразчина $\overline{D_{\max} - D_{\min}}$ ном (расплавленном) состоянии. На рис. З приведена в качестве примера кривая плавления для двунитевого гомополинуклеотида *) (т. е. полинуклеотида, состоящего из одинаковых пар оснований), а на рис. 4 (кривая 1)-для ДНК фага Т2. Гидродинамические характеристики - константа седиментации, вязкость и др. (см. рис. 4, кривая 2) — также меняются

^{*)} Разные двунитевые гомополинуклеотиды, как рибо-, так и дезоксирибо-, имеют совершенно аналогичные по форме кривые плавления, отличающиеся друг от друга только температурой плавления. Наиболее полное исследование кривых плавления различных двунитевых гомополинуклеотидов проведено Чемберленом ³.

при переходе спираль — клубок. Эти величины характеризуют изменение размеров макромолекулы при переходе. Параллельное измерение степени спиральности оптическим и размера молекул гидродинамическим методом дает возможность найти среднюю длину спирального участка v в молекуле ДНК. Такие измерения были недавно проведены в работах ^{4, 5}



Рис. 3. Кривая плавления гомополинуклеотида².

Рис. 4. Кривая плавления (1), измеренная по оптическому поглощению, и зависимость характеристической вязкости от температуры (2) для ДНК фага T2⁴.

(см. ниже, рис. 19). Пересчет зависимости v (ϑ) по экспериментальным данным оказался затрудненным вследствие специфических объемных эффектов в ДНК, обнаруженных в работе ⁴. Поэтому удалось получить достаточно надежные значения лишь для $\vartheta > 0.8$. Наконец, переход спираль — клубок исследуют микрокалориметрически. Микрокалориметрия дает возможность не только наблюдать переход спираль — клубок по изменению теплоемкости раствора, но и определять теплоту перехода ⁶, ⁷. Однако для проведения микрокалориметрических исследований ДНК требуется уникальная экспе-

риментальная техника, что сильно ограничивает возможности использования метода.

Кривую плавления удобно характеризовать двумя параметрами температурой плавления T_m , отвечающей точке перегиба кривой, и шириной интервала плавления ΔT , равной разности температур, при которых касательная в точке пере гиба пересекает уровни $\vartheta = 0$ и $\vartheta = -$ = 1 (ϑ — степень спиральности, т. е. доля звеньев в спиральном состоянии). Таким образом,

$$\Delta T = \frac{1}{\left| \frac{\partial \Phi}{\partial T} \right|_{\max}} . \tag{1}$$

Имеющиеся в природе ДНК довольно сильно отличаются по отно-



Рис. 5. Связь между ГЦ-содержанием ДНК и ее температурой плавления ⁸.

сительному содержанию в них АТ- и ГЦ-пар. При этом температура плавления ДНК растет при увеличении концентрации ГЦ-пар x_0 ($x_0 = (\Gamma + + \Pi)/(A + T + \Gamma + \Pi)$) (рис. 5). Как видно из рисунка, зависимость

T_m от x₀ строго линейна. Температура плавления ДНК существенно зависит от среды, в которой растворены молекулы. Обычно ДНК находится в солевом растворе, причем, как правило, используются соли натрия. При нейтральном *pH* температура плавления ДНК подчиняется эмпирической формуле

$$T_m = 176,0 - (2,60 - x_0)(36,0 - 7,04 \lg [Na^+]), \tag{2}$$

Температура плавления зависит также

Ширина интервала плавления ДНК

Следует отметить, что различные свой-

ства ДНК надежно исследованы в насто-

ящее время в основном только для усло-

вий среды, близких к стандартным. Стандартными условиями, отвечающими условиям в клетке, являются следующие: pH = 7, [Na⁺] = 0,195 *M*. В дальнейшем,

где T_m — температура плавления в °С, [Na+] — молекулярная концентрация ионов Na. На рис. 6 приведены экспериментальные данные, полученные в работе ⁹ (точки) для четырех различ-



Рис. 6. Зависимость температуры плавления ДНК Т_т от логарифма концентрации йонов натрия в растворе.

Точки — экспериментальные данные, полученные в работе ⁹: 1 — M. lyso-deikticus ($x_0 = 0,72$); 2 — E. coli ($x_0 = = 0,50$); 3 — S. saprophyticus($x_0 = 0,33$); 4 — M. mycoides var capri ($x_0 = 0,24$). Прямые линии проведены по формуле (2) иля соотрествующих зараговий – (2) для соответствующих значений хо.

если это специально не оговорено, мы будем предполагать, что ДНК находится вблизи этих условий.

 $\approx 0.5^{\circ}$.

Особенно сильное влияние на кривые плавления оказывают вещества, прочно связывающиеся с молекулой ДНК. Молекулы таких веществ будем называть в дальнейшем скрепками. В отличие от агентов, меняющих свойства среды в целом (таких, как соли или рН), скрепки, прочно связываясь с ДНК, могут существенно изменять кривые плавления, когда их молярная концентрация D в растворе значительно меньше молярной концентрации Р оснований, входящих в состав ДНК. К такого рода веществам относятся: ионы тяжелых металлов (Си, Fe и др.), некоторые антибиотики (актиномицин) и красители (акридиновый оранжевый, профлавин), некоторые белки.

В качестве примера на рис. 7 приведена зависимость ΔT от концентрации белка рибонуклеазы. Существенно подчеркнуть, что скрепки связаны с ДНК межмолекулярными силами и за время опыта перераспределяются на молекуле ДНК, занимая при каждой температуре термодинамически наиболее выгодное состояние.

Приведенные экспериментальные данные относятся к обычно исследуемой в растворе линейной, незамкнутой ДНК. В ряде вирусов, а также в клетках бактерий на некоторых стадиях их развития обнаруживается особая кольцевая замкнутая форма ДНК.

В такой ДНК, представляющей собой обычную двойную спираль, каждая из комплементарных нитей является непрерывной замкнутой на себя. Поэтому полное число оборотов одной нити относительно другой не может меняться ни при каких изменениях условий, сохраняющих целостность сахаро-фосфатного остова обеих нитей. Проведенные исслелования показали¹¹, что при

комнатной температуре двойная спираль кольцевой ДНК закручена как целое в суперспираль (с плотностью один виток суперспирали на 200 пар оснований) противоположного знака, т. е. в левую. При нагревании происходит тепловое расширение «кристалла» ДНК и уменьшение степени закрученности двойной спирали. Это приводит к уменьшению суперспирализации. При некоторой температуре (около 40 °С), отвечающей температуре, при которой была первоначально образована замкнутая кольцевая молекула в клетке, суперспирализация полностью исчезает. При дальнейшем нагревании происходит раскручивание двойной спирали и образование



Рис. 7. Зависимость ширины интервала плавления ДНК от концентрации рибонуклеазы в растворе ¹⁰.

суперспирали того же знака (правой). Иными являются и характеристики плавления кольцевой замкнутой ДНК¹². Температура плавления такой ДНК приблизительно на 20° выше, чем для линейной молекулы (рис. 8). Это происходит потому, что расплавленные нити в кольцевой молекуле

остаются закрученными друготносительно друга и энтропия расплавленного состояния меньше, чем для линейной молекулы. Кроме того, ширина интервала плавления замкнутой кольцевой ДНК в 2—3 раза больше, чем ширина интервала плавления линейной молекулы.



Рис. 8. Кривые плавления кольцевой замкнутой ДНК полиомы (1) и той же ДНК с разрывом в одной из нитей (2) в 7,2 *М*-ном растворе NaClO₄ ¹².



Рис. 9. Кривые плавления ДНК фага T2 при различных значениях числа звеньев в молекуле¹³: $1 - 3,3 \cdot 10^4; 2 - 9,0 \cdot 10^2; 3 - 4,5 \cdot 10^2;$ $4 - 2,9 \cdot 10^2.$

Изложенные данные относятся к плавлению высокомолекулярной "ДНК. Кривые плавления не зависят от длины цепи в широком интервале

изменения длины. Однако при достаточно сильной фрагментации молекулы происходят изменения кривых плавления — уменьшение температуры плавления и увеличение ширины интервала плавления (рис. 9).

Таковы основные факты, касающиеся перехода спираль — клубок в ДНК. В ходе дальнейшего рассмотрения мы будем привлекать, по мере необходимости, дополнительные экспериментальные сведения. Из излоясны женного задачи теории: 1) Выбор модели. 2) Построеперехода спираль — клубок для гомополинуклеотидов. ние теории 3) Построение теории перехода спираль — клубок в гетерополинуклеотидах с учетом различия в стабильности разных мономерных звеньев (АТ- и ГЦ-пар). Эта теория должна объяснить существенное увеличение ΔT при переходе от гомополимера к гетерополимеру и от линейной ДНК к замкнутой. Кроме того, теория должна объяснить зависимость параметров кривых плавления от длины цепи.

III. ПЕРЕХОД СПИРАЛЬ — КЛУБОК В ГОМОПОЛИМЕРАХ

1. Однонитевый гомополимер (модель Изинга)

Начнем рассмотрение с простейшей модели гомополимера — модели Изинга. Одномерная модель Изинга всесторонне исследована и широко применяется в самых разных областях физики (см., например, обзор ¹⁴). Ниже дается элементарное решение модели и получены формулы, используемые в теории переходов спираль — клубок.

Пусть дана линейная цепочка из N звеньев, каждое звено которой может находиться в двух состояниях — расплавленном (1) и спиральном (2). Макроскопическое состояние системы полностью определяется заданием значений трех переменных: числа звеньев в состоянии 1 (N_1), числа звеньев в состоянии 2 (N_2) и числа областей, состоящих из звеньев сорта 1 (или 2), n *).

Число микросостояний, отвечающих заданным значениям N_1 , N_2 и n, равно числу способов, которым можно разместить N_1 одинаковых элементов по n группам и одновременно другие N_2 одинаковых элементов по n группам, что равно W_1W_2 , где

$$W_1 = \frac{(N_1 - 1)!}{(n - 1)! (N_1 - n)!},$$
(3)

$$W_2 = \frac{(N_2 - 1)!}{(n - 1)! (N_2 - n)!}.$$
(4)

Поскольку имеется в виду предельный переход $N \to \infty$, единицей можно пренебречь. Равновесные значения величин N_1 , N_2 и *п* могут быть найдены из условия минимума «неравновесной» свободной энергии **)

$$F = N_1 F_1 + N_2 F_2 + nF_s - T \left(\ln W_1 + \ln W_2 \right) \tag{5}$$

при условии $N_1 + N_2 = N$; здесь F_1 и F_2 — (свободные) энергии звеньев, находящихся в расплавленном и спиральном состояниях соответственно. Разность $F_1 - F_2 \equiv \Delta F = U - T \Delta S$. Теплота плавления $U \approx 7 - 9$ ккал/моль (3500-4500 °K)^{6,7} связана как с разрывом водородных связей между основаниями комплементарных нитей, так и с разрушением «межплоскостного» взаимодействия между соседними вдоль цепи парами оснований. Разность энтропий расплавленного и спирального состоя-

^{*)} Предполагается, что N -> ∞ и концевыми эффектами можно пренебречь.

^{**)} Здесь и ниже полагается, как обычно, что энергия и температура измеряются в одних и тех же единицах.

ний ΔS связана с увеличением числа степеней свободы каждого из нуклеотидов при переходе в расплавленное состояние. Величину ΔS можно грубо оценить, если учесть, что в расплавленном состоянии каждый нуклеотид приобретает 6 вращательных степеней свободы (см. рис. 1, *a*), а пара нуклеотидов соответственно 12, и для каждого вращения имеются 2—3 минимума энергии. Это дает, грубо говоря, $\Delta S \approx 12$. Точка плавления T_m полимера определяется из условия $\Delta F = 0$, что дает

$$T_m = U/\Delta S.$$

Следовательно, T_m должна быть порядка 300—400 °К, что примерно соответствует экспериментальному значению 340—380 °К. Величина F_s — это добавочная (свободная) энергия, возникающая при образовании одного расплавленного участка внутри спиральной области. Грубо говоря, эта добавочная энергия возникает вследствие того, что при разрыве v пар оснований разрушается v + 1 межплоскостное взаимодействие. В более общем случае введение величины F_s отражает то обстоятельство, что в пограничной области между расплавленными и спиральными участками полимера звенья могут находиться в некоторых промежуточных состояниях. Для справедливости формулы (5) и всего дальнейшего рассмотрения требуется, чтобы размеры этих пограничных областей были значительно меньше размеров расплавленных и спиральных участков, возникающих в интервале плавления. Применив формулу Стирлинга. получим

$$F = N_1 F_1 + N_2 F_2 + nF_s - T [N_1 \ln N_1 - n \ln n - (N_1 - n) \ln (N_1 - n) + N_2 \ln N_2 - n \ln n - (N_2 - n) \ln (N_2 - n)].$$

Из условия $\left(\frac{\partial F}{\partial n}\right)_{N_1N_2} = 0$ получим

$$\left(\frac{N_1}{n} - 1\right) \left(\frac{N_2}{n} - 1\right) = \frac{1}{\sigma}, \qquad (6)$$

где $\sigma = e^{-\frac{F_{2}^{\circ}}{T}}$. Из условия $\left(\frac{\partial F}{\partial N_{1}}\right)_{n} = 0$ получим

$$\frac{1 - \frac{n}{N_2}}{1 - \frac{n}{N_1}} = s,$$
(7)

где $s = e^{\frac{F_1 - F_2}{T}}$.

Полученные уравнения дают зависимость N_1 , N_2 и *n* от *s*, которая однозначно связана с температурой. Так, например, для доли звеньев $\vartheta = N_2/N$, находящихся в спиральном состоянии, получается уравнение

$$\frac{1-2\vartheta}{\sqrt{\vartheta(1-\vartheta)}} = \frac{1}{\sqrt{\sigma}} \frac{1-s}{\sqrt{s}}.$$
(8)

Среднее число звеньев в спиральном участке равно (при $\sigma \ll 1$)

$$\mathbf{v}_2 = \frac{N_2}{n} = \frac{1}{\sqrt{\sigma}} \left(\frac{\vartheta}{1-\vartheta}\right)^{1/2}$$

Из формулы (8) следует простое выражение для ширины интервала плавления

$$\Delta T = 4 \sqrt{\sigma} \frac{T_m^2}{U}.$$

Отметим, что в случае отсутствия взаимодействия между звеньями ($\sigma = -1$, $F_s = 0$) формула (8) переходит в распределение Больцмана.

Этот предельный случай отвечает отсутствию кооперативности: энергия образования границы между расплавленным и спиральным участком равна нулю (т. е. $F_s = 0$), спиральные и расплавленные звенья «перемешаны» совершенно случайным образом. При увеличении поверхностной энергии (уменьшении σ) происходит рост кооперативности системы: увеличивается средняя длина одного спирального и расплавленного участка и соответственно уменьшение ширины интервала плавления. В предельном случае $\sigma \rightarrow 0$ мы имеем полностью кооперативный абсолютно резкий переход.

Рассмотренная модель отвечает физически случаю однонитевого гомополимера (см. примечание 5). Действительно, в однонитевом полимере число состояний *i*-го расплавленного участка, состоящее из v_i сегментов (свободно сочлененных звеньев), равно

$$w_i = w_0^{v_i},$$

причем

$$\sum_{i=1}^n v_i = N_i.$$

Поэтому добавочный вклад в энтропию системы будет равен

$$\sum_{i=1}^n \ln w_i = N_1 \ln w_0.$$

Свободная энергия будет выражаться формулой (5) с заменой F_1 на $F_1 - T \ln w_0$.

2. Двунитевый гомополимер

Два случая двунитевого полимера, каковым являются полинуклеотиды, рассмотренная модель не годится, так как в этом случае энтропия расплавленной части полимера не является аддитивной величиной. В самом деле, расплавленные области в двунитевом полимере представляют собой замкнутые полимерные цепи. Число состояний замкнутой полимерной цепочки равно числу состояний разомкнутой цепочки $w_0^{V_i}$, помноженному на вероятность того, что цепочка окажется замкнутой (т. е. что ее начало и конец окажутся внутри некоторого малого объема δV):

$$w_{i} = \frac{w_{0}^{V_{i}}}{v_{i}^{3/2}} \left(\frac{3}{2\pi}\right)^{3/2} \frac{\delta V}{l^{3}}, \qquad (9)$$

где l — длина сегмента цепочки (см. примечание 6). Формулу (9) часто называют формулой Якобсона — Стокмайера ¹⁵. Следует подчеркнуть, что формула (9) дает полное число состояний замкнутой цепочки, включая состояния, для достижения которых необходимо самопересечение нити. В самом деле, при выводе формулы (9) учитывались как состояния без узлов, так и состояния с узлами. Очевидно, что физически переход от состояния без узлов к состоянию с узлами невозможен без разрыва цепи. Поэтому число состояний замкнутой петли меньше величины, даваемой формулой (9).

Для того чтобы формула (9) была справедлива, необходимо, чтобы была возможность образования узлов. Такая возможность в полимере имеется благодаря наличию свободных концов. Свободные концы, совершая сложное движение, могут создавать на крайнем расплавленном участке узлы, которые затем будут проникать внутрь полимера (рис. 10). Таким образом, для того чтобы можно было применять формулу типа (9), необходимо, чтобы за время опыта успевала проходить релаксация по количеству узлов (топологическая релаксация). Время такой релаксации весьма трудно оценить. Поэтому мы рассмотрим задачу о переходе спираль — клубок в гомополимере в общем виде, задавшись в качестве



Рис. 10. Образование узла и его миграция внутрь молекулы.

множителя при числе состояний расплавленной области произвольной функцией f(v), считая, что она имеет асимптотический вид $v^{-\alpha}$ (вопрос об истинном значении α обсуждается ниже). Рассмотрению перехода спираль — клубок в гомополимерах с учетом множителя $v^{-\alpha}$ был посвящен ряд работ ¹⁶⁻²³. Ниже дано общее рассмотрение этого вопроса методом, отличным от примененных в указанных работах.

Число состояний двунитевого полимера из N_1 расплавленных звеньев, N_2 спиральных звеньев и *n* спиральных и клубкообразных участков равно W_1W_2 , причем W_2 по-прежнему равна (4), а

$$W_{i} = \sum_{\{\nu\}=1}^{\infty} \sum_{\{\mu\}=1}^{\infty} \prod_{i=1}^{n} f(\nu_{i} + \mu_{i}) \,\delta\left(N_{i} - \sum_{i=1}^{n} \nu_{i}\right) \,\delta\left(N_{i} - \sum_{i=1}^{n} \mu_{i}\right); \quad (10)$$

здесь {v} и {µ}—числа звеньев в отрезках соответственно первой и второй нитей,

$$\delta(k) = \begin{cases} 1 & \text{при} \quad k = 0, \\ 0 & \text{при} \quad k \neq 0. \end{cases}$$

Для того чтобы осуществить суммирование в формуле (10), воспользуемся математическим приемом, впервые примененным Дарвином и Фаулером (см., папример, ²⁴). Подставим в (10) вместо δ -символов их интегральные представления

$$\delta(k) = \frac{1}{2\pi i} \oint_C \mathbf{z}^{-k-1} \, d\mathbf{z},$$

где С — любой контур в комплексной плоскости, охватывающий начало координат. Получим

$$W_{1} = \left(\frac{1}{2\pi\iota}\right)^{2} \oint_{C_{1}} \oint_{C_{2}} dz_{1} dz_{2} z_{1}^{-N_{1}-1} z_{2}^{-N_{1}-1} \left[\Phi\left(z_{1}, z_{2}\right)\right]^{n}, \tag{11}$$

7 УФН, том 105, вып. 3

где

$$\Phi(z_1, z_2) = \sum_{\nu=1}^{\infty} \sum_{\mu=1}^{\infty} f(\nu + \mu) z_1^{\nu} z_2^{\mu} = \left[\sum_{\nu=1}^{\infty} \left(\frac{z_1}{z_2}\right)^{\nu} \sum_{\mu=1}^{\infty} f(\nu + \mu) z_2^{\nu + \mu}\right].$$

Воспользовавшись тождеством

$$\sum_{n=1}^{\infty} a_n \sum_{m=n+1}^{\infty} b_m = \sum_{n=2}^{\infty} b_n \sum_{m=1}^{n-1} a_m$$

и проведя суммирование, получим

r

$$\Phi(z_1, z_2) = \frac{z_1 z_2}{z_1 - z_2} \sum_{\nu=1}^{\infty} f(\nu + 1) (z_1^{\nu} - z_2^{\nu}).$$
(12)

Вычислим двойной интеграл (11) методом перевала в предположении, что $N_1 \gg n$. Анализ показывает, что перевальная точка z_0 находится при $z_1 = z_2$, т. е. может быть найдена из условия

$$dg(z)/dz=0,$$

где

$$g(z) = -2(N_1+1)\ln z + n\ln \Phi(z, z).$$
(13)

При этом

$$\ln W_{\mathbf{1}} = g\left(\mathbf{z}_{0}\right)$$

Легко видеть, что

$$\Phi(z, z) = \sum_{\nu=1}^{\infty} \nu f(\nu+1) z^{\nu+1}, \qquad (14)$$

причем перевальная точка лежит вблизи z = 1.

Для вычисления W₁ в явном виде необходимо рассмотреть отдельно различные области значений α.

1) $\alpha < 2$. Так как z близко к 1, суммирование в формуле (14) можно заменить интегрированием:

$$\Phi(z, z) = \left(\ln\frac{1}{z}\right)^{\alpha-2} \int_0^\infty x^{-\alpha+1} e^{-x} dx = \left(\ln\frac{1}{z}\right)^{\alpha-2} \Gamma(2-\alpha).$$

Подставляя это в формулу (13) и приравнивая производную нулю, найдем перевальную точку:

$$z_0 = \exp\left(-\frac{n}{N_1}\frac{2-\alpha}{2}\right)$$

Окончательно имеем

$$\ln W_{i} = 2n\beta \left(1 - \ln\beta - \ln\frac{n}{N_{i}}\right) + n\ln\Gamma(2\beta), \qquad (15)$$

где

$$\beta = (2 - \alpha)/2.$$

2) $2 < \alpha < 3$. В этом случае формулу (14) преобразовать в интеграл нельзя, так как получающийся интеграл расходится на нижнем пределе. Эта сумма, однако, преобразуется к виду

$$\Phi(z, z) = A - B\left(\ln\frac{1}{z}\right)^{\alpha-2},$$

где

$$A = \sum_{\nu=1}^{\infty} \nu f(\nu+1), \quad B = \int_{0}^{\infty} x^{-\alpha+1} (1-e^{-x}) \, dx.$$

490

Перевальная точка

$$z_0 = \exp\left\{-\left(\frac{B}{A}\frac{\alpha-2}{2}\frac{n}{N_1}\right)^{\frac{1}{3-\alpha}}\right\},\,$$

откуда

$$\ln W_1 = n \left[\ln A - C \left(\frac{n}{N_1} \right)^{\frac{\alpha - 2}{3 - \alpha}} \right], \tag{16}$$

где

$$C = (3-\alpha) \left(\frac{B}{A}\right)^{\frac{1}{3-\alpha}} \left(\frac{\alpha-2}{2}\right)^{\frac{\alpha-2}{3-\alpha}} > 0.$$

Перейдем к вычислению равновесных значений N_1 , N_2 и *п*. Они находятся из условия минимума «неравновесной» свободной энергии (5), где W_2 дается формулой (4), а W_1 — формулами (15) и (16) для случаев $\alpha < 2$ и $2 < \alpha < 3$ соответственно. Вновь рассмотрим эти два случая по отдельности.

1) $\alpha < 2$. Минимизация формулы (5) приводит к уравнениям

$$\left(\frac{N_1}{n}\right)^{2\beta} \frac{N_2}{n} = \frac{\beta^{2\beta}}{\Gamma(2\beta)} \frac{1}{\sigma}, \qquad (17)$$

$$\left(1 - \frac{n}{N_2} + 2\beta \frac{n}{N_1}\right) = s. \tag{18}$$

Для зависимости степени спиральности ϑ от температуры (т. е. от s) получаем уравнение (заменив $\beta = \frac{2-\alpha}{2}$)

$$\frac{1-(3-\alpha)\vartheta}{(1-\vartheta)^{\frac{1}{3-\alpha}}\vartheta^{\frac{2-\alpha}{3-\alpha}}} = \frac{1-s}{\left[\sigma\Gamma(2-\alpha)\left(\frac{2-\alpha}{2}\right)^{\alpha-2}\right]^{\frac{1}{3-\alpha}}}.$$
 (19)

Средняя длина спирального участка $v_2 = N_2/n$ равна

$$\mathbf{v}_{2} = \left[\frac{1}{\sigma} \frac{\left(\frac{2-\alpha}{2}\right)^{2-\alpha}}{\Gamma(2-\alpha)}\right]^{\frac{1}{3-\alpha}} \left(\frac{\vartheta}{1-\vartheta}\right)^{\frac{2-\alpha}{3-\alpha}}.$$
 (20)

Из формулы (19) следует, что точке s=1, т. е. $F_1=F_2$, отвечает не значение $\vartheta=1/2$, как в случае однонитевого гомополимера, а значение $\vartheta=1/(3-\alpha)$. При этом

$$\mathbf{v}_2 = \left[\sigma 2^{2-\alpha} \Gamma\left(2-\alpha\right)\right]^{-\frac{1}{3-\alpha}}.$$
(21)

Из сравнения формулы (19) с формулой (8) видно, что случай однонитевого гомополимера формально содержится в формулах (19), (20), если в них положить $\alpha = 1$ и заменить 2 σ на σ .

Для определения ширины интервала плавления
$$\Delta T$$
 необходимо
вычислить $\left|\frac{\partial \vartheta}{\partial s}\right|_{\max}$, что равно с хорошей точностью
 $\left|\frac{\partial \vartheta}{\partial s}\right|_{\max} = \frac{1}{8} \frac{3-\alpha}{2-\alpha} \left[1 + \frac{1}{4} \left(\frac{1-\alpha}{3-\alpha}\right)^2 \frac{1}{1+2\frac{2-\alpha}{(3-\alpha)^2}}\right] \times \left[\sigma\Gamma\left(2-\alpha\right) \left(\frac{2-\alpha}{2}\right)^{\alpha-2}\right]^{-\frac{1}{3-\alpha}}$. (22)
7*

2) 2 <
$$\alpha$$
 < 3. Подставив (4) и (16) в (5), получим
 $F = N_1 F_1 + N_2 F_2 + n F_s^* - Tn \left[1 - \ln \frac{n}{N_2} - C \left(\frac{n}{N_1} \right)^{\gamma} \right],$ (23)

где

$$F_s^* = F_s - T \ln A, \quad \gamma = \frac{\alpha - 2}{3 - \alpha}$$

Условие $\frac{\partial F}{\partial n} = 0$ дает

$$F_s^* + T \ln \frac{n}{N_2} + TC \left(\gamma + 1\right) \left(\frac{n}{N_1}\right)^{\gamma} = 0.$$
(24)

Напомним, что рассмотрение проводится в предположении, что $n \ll N_4$ и $n \ll N_2$, т. е. $\sigma^* = e^{-\frac{F_s^*}{T}} \ll 1$. В этом приближении решение уравнения (24) относительно *n* имеет вид

$$n = \sigma^* N_2 \left[1 - C \left(\gamma + 1 \right) \left(\sigma^* \frac{N_2}{N_1} \right)^{\gamma} \right].$$
(25)

Подставив (25) в (23), получим

$$F = N_1 F_1 + N_2 F_2^* + DN_1 \left(\frac{N_2}{N_1}\right)^{\nu+1},$$
(26)

где

$$F_2^* = F_2 - T\sigma^*, \ D = TC(\sigma^*)^{\gamma+1} > 0.$$

Из формулы (26) видно, что при $N_2/N_1 \rightarrow 0$ производные F по N_1 могут испытывать разрыв при сохранении непрерывности самой свободной энергии F, т. е. в окрестности этой точки будет происходить фазовый переход второго рода. В окрестности перехода можно положить $N_1 \approx N$ и, введя переменную $\eta^2 = N_2/N$, получим (опустив не зависящее от η слагаемое)

$$\frac{F}{N} = \Delta S \left(T - T_0 \right) \eta^2 + D \eta^{2(\gamma+1)}, \tag{27}$$

где ΔS — разность энтропий расплавленного и спирального состояний гомополимера в расчете на одно звено.

Как видно из формулы (27), фазовые переходы в рассматриваемой модели укладываются в обобщенную схему Ландау ²⁵. При $T > T_0$ минимум достигается при $\eta^2 = 0$, т. е. в состоянии, отвечающем полностью расплавленному гомополимеру. При $T < T_0$ минимум F достигается при отличной от нуля доле спиральных звеньев, которая равна

$$\frac{N_2}{N} = \eta^2 = E \left(T_0 - T \right)^{\frac{1}{\gamma}},$$
(28)

где

$$E = \left[\frac{\Delta S}{D(\gamma+1)}\right]^{\frac{1}{\gamma}}.$$

Интересно отметить, что при изменении параметра α от 2 до 3 γ меняется от 0 до ∞ , что приводит к чрезвычайно сильной зависимости характера перехода от α . Получающаяся в обычной теории Ландау зависимость $\eta \propto |T_0 - T|^{1/2}$ возникает в рассматриваемой модели при $\alpha = 5/2$.

Таким образом, при различных значениях α рассматриваемая система ведет себя существенно различным образом. При $\alpha < 2$ кривая плавления представляет собой функцию, непрерывную вместе со всеми своими производными. Следовательно, даже при температуре, заметно превышающей

492

«температуру плавления» T_m , в полимере остается некоторая конечная концентрация спиральных звеньев. Если же $\alpha > 2$, то плавление полимера приобретает характер фазового перехода: при температурах, превышающих критическое значение T_0 , весь полимер оказывается полностью расплавленным. В интервале $2 < \alpha < 3$ по мере увеличения α постепенно уменьшается порядок производной, испытывающей разрыв в точке T_0 . При $\alpha > 3$ разрывной является уже сама кривая плавления ¹⁹.

Вопрос об истинном значении α для двунитевого гомополимера остается пока открытым. Величина $\alpha = 3/2$ получается в условиях прохождения полной топологической релаксации. Однако в этом случае могут



Рис. 11. Два расплавленных участка гомополинуклеотида, закрученных друг относительно друга.

возникать в принципе спиральные участки, образованные нитями из разных расплавленных областей (рис. 11). Учет таких состояний весьма труден вследствие того, что задача перестает быть одномерной. Можно, однако, показать (А. М. Дыхне, неопубликованные результаты), что в случае такой полной топологической релаксации фазовых переходов не происходит. Рассмотрение реальной ситуации осложняется тем, что спиральные области, образованные путем закручивания двух различных клубкообразных участков, не могут возникнуть путем диффузии таких элементов с концов цепи, как это имеет место в случае узлов (см. рис. 11), так как проскальзывание нитей в спиральных областях невозможно. Поэтому время релаксации с образованием таких спиральных участков должно экспоненциально расти с увеличением длины цепи. С другой стороны, возможно образование спиральных участков между двумя расплавленными участками в условиях отсутствия топологической релаксации, но в этом случае оставшиеся части расплавленных участков, не вошедшие в спиральную область, должны быть закручены друг относительно друга на столько же оборотов, сколько витков имеет спиральный участок. но в противоположную сторону (влево, так как спираль ДНК правая). Это приведет к дополнительным энтропийным эффектам, учет которых весьма затруднит решение задачи. Наконец, необходимо учитывать эффекты исключенного объема, что может приводить к изменению величины с 21.

Наиболее разумным в создавшейся ситуации было бы рассматривать α в качестве параметра теории и пытаться его определить путем сравнения полученных выше формул с экспериментом. Такая попытка была сделана Эпплквистом ²⁶ для случая двуспиральной поли-А Эпплквист считает, что полученные им экспериментальные данные доказывают, что при плавлении поли-А в некоторых условиях наблюдается фазовый переход второго рода. Однако, для того чтобы делать столь важный вывод, требуется, по нашему мнению, более тщательная постановка опытов, а главное — проведение контрольных экспериментов на высокомолекулярность и гомогенность препаратов полинуклеотидов. Данные, полученные другими авторами ^{2, 3}, свидетельствуют о том, что в большинстве случаев кривая плавления является гладкой. В целом следует подчеркнуть, что имеется слишком мало работ, посвященных экспериментальному изучению перехода спираль — клубок в гомополинуклеотидах, и поэтому нахождение значения α из эксперимента пока невозможно.

В связи с таким положением нельзя признать лишенной смысла попытку оценить величину σ , исходя из предположения о том, что $\alpha = 3/2$, как это было сделано впервые Крозерсом и Зиммом¹⁸. Так как ΔT для гомополимеров имеет величину около 0,5, полученные значения σ лежат в интервале $10^{-4}-10^{-5}$. Отметим, что такая оценка согласуется по порядку величины с оценкой σ , получаемой из совершенно иных данных из данных по кинетике взаимодействия ДНК с медленно реагирующим агентом (формальдегидом)²⁷. Следует подчеркнуть, что оба метода оценки σ не являются вполне удовлетворительными, и потому необходимо в дальнейшем уточнение этих оценок. Однако то, что оба метода дают близкие результаты, позволяет использовать оценку, пока не будет найдено более точное значение.

Кроме задачи о плавлении двунитевых гомополимеров в литературе рассмотрена также задача о плавлении трехнитевых гомополимеров ^{28, 29} и задача о плавлении гетерополимеров со строго чередующейся последовательностью звеньев ^{30–32}. Первая задача рассматривается в связи с переходом спираль — клубок в трехнитевых комплексах поли-А + 2 поли-У, вторая — в связи с плавлением полимера поли-АТ (т. е. полимера с последовательностью звеньев ...АТАТАТАТ...). В этих случаях, однако, адекватность рассмотренных моделей реальным ситуациям еще более сомнительна, чем в случае гомополинуклеотидов, рассмотренном выше.

3. Плавление комплексов полинуклеотидов со скрепками

Рассмотрим теперь полимер, находящийся в комплексе с молекулами низкомолекулярного вещества (скрепками). При этом имеется в виду обратимый комплекс, так что при каждой температуре за время опыта успевает установиться равновесное распределение скрепок между спиральными и клубкообразными частями полимера. Такой «раствор» скрепок в полимере отвечает, в случае фазовых систем, бинарным растворам. Как известно, в таких бинарных системах фазовый переход размазывается и происходит в широком температурном интервале вследствие изменения концентрации растворенного вещества в жидкой фазе по мере кристаллизации. Таким образом, перераспределение растворенного вещества между твердой и жидкой фазами приводит к радикальным применениям в плавлении фазовой системы. Если перераспределения не происходит (как это имеет место при насыщающей концентрации), то система претерпевает обычный фазовый переход. На рис. 12 приведены данные о зависимости теплоемкости чистой воды и раствора соли от температуры, наглядно иллюстрирующие сказанное.

Уравнения, описывающие свойства бинарной фазовой системы, получаются из условия равенства химических потенциалов растворителя и растворенного вещества и для слабых растворов имеют вид (см.,

494

например, ²⁵)

$$\frac{U}{T_0} (T - T_0) = (C_1 - C_2) T_0, \qquad (29)$$

$$\frac{C_2}{C_1} = p, \tag{30}$$

$$C_1(1-\vartheta) + C_2\vartheta = C, \tag{31}$$

где U и T_0 — теплота и температура плавления растворителя, C_1 и C_2 — концентрации растворенного вещества в жидкой и твердой фазах, ϑ — доля вещества в твердой фазе, p — коэффициент распределения растворенного вещества между

фазами. Для раствора соли в воде, когда $C_2 = 0$, имеем

$$1-\vartheta=\frac{T_0^2}{U}\frac{C}{T-T_0}.$$

Теплоемкость равна

$$c_{\mathrm{yg}} = T \, \frac{\partial S}{\partial T} = - T_0 \, \Delta S \, \frac{\partial \vartheta}{\partial T},$$

где $\Delta S = \frac{U}{T_0}$ — энтропия плавления. Получаем окончательно

$$c_{\rm yg} = \frac{T_0^2}{(T - T_0)^2} C. \tag{32}$$

Эта формула хорошо описывает зависимость теплоемкости от температуры в интервале между точкой плавления T_0 и эвтектической точкой

(рис. 12)*). При произвольном *р* легко получить следующие выражения для сдвига температуры и ширины интервала плавления:

$$\delta T_m = 2 \, \frac{p-1}{p+1} \, \frac{T_0^2}{U} \, C; \tag{33}$$

$$\Delta T = 4 \left(\frac{p-1}{p+1}\right)^2 \frac{T_0^2}{U} C, \qquad (34)$$

где $\delta T_m = T_m - T_0$, температура плавления T_m определена как температура, при которой $\vartheta = 1/2$, ΔT определяется соотношением $\Delta T = 1 \left/ \left| \frac{\partial \vartheta}{\partial T} \right|_{T=T_m}$.

При рассмотрении комплекса гомополимера со скрепками оказалось, что результаты, получающиеся для фазовых систем, полностью остаются в силе. Так, была строго показана справедливость формул (33) и (34) в этом случае ^{34, 22}. При этом в формуле (34) под ΔT следует понимать $\delta \Delta T$ — разность ширин перехода полимера со скрепками и чистого гомополимера. Подробный анализ показывает ^{22, 35}, что наличие скрепок совершенно не влияет на способ разбиения полимера на спиральные и клубкообразные области. Поэтому к ширине плавления чистого гомополимера просто прибавляется ширина, вызванная перераспределением скрепок, причем перераспределение происходит в точности так же, как в фазовой системе. В работе ²² получены также общие формулы для δT_m



Рис. 12. Температурная зависимость парциальной теплоемкости воды в 0,15*N*-ном растворе NaCl (точки) ³³.

Сплошная кривая проведена по формуле (32).

^{*)} Для представленных на рис. 12 экспериментальных данных $C \approx 2 \frac{0.15}{55} = 5.4 \cdot 10^{-3}$. Для того чтобы найти $c_{\rm YR}$ в кал/г.град, нужно правую часть формулы (32) помножить на газовую постоянную, равную 2 кал/моль.град, и поделить на 18. Тогда формула (32) даст кривую, проведенную на рис. 12 сплошной линией, причем тепло-емкость отсчитывается от уровня, проведенного штриховой линией. Резко выпавшая точка на графике при температуре около —22 °С отвечает плавлению эвтектики.

и $\delta \Delta T$, справедливые при любой концентрации скрепок на полимере При этом изменение ширины перехода, вызванное скрепками, при любых C не зависит от ширины для гомополимера, т. е. от фактора кооперативности. Зависимость температуры и ширины интервала перехода



Рис. 13. Теоретическая зависимость температуры и ширины интервала плавления комплекса гомополимера со скрепками от концентрации скрепок³⁵, ²².

для p=5 изображена на рис. 13. Как видно из рисунка, теория качественно объясняет экспериментальные результаты рис. 7. Количественно теория подробно сравнивалась с экспериментом для области малых С (формулы (33), (34)). Из этих измерений была найдена, независимо от микрокалориметрических данных, теплота плавления ДНК^{10, 36}. По аналогии с кривыми равновесия фазовых систем можно сказать, что диаграмма состояния для комплекса полимера со скрепками имеет вид сигары. Это утверждение надо, разумеется, понимать условно, так как разделения на макроскопические фазы в этом случае не происходит: «жидкая» и «твердая» «фазы» остаются перемешанными.

IV. ПЕРЕХОД СПИРАЛЬ — КЛУБОК В ГЕТЕРОПОЛИМЕРАХ

Рассмотрим задачу о внутримолекулярном плавлении реальной ДНК, состоящей из звеньев двух сортов — легкоплавких АТ и туго-

плавких ГЦ., Полимер, состоящий из одних только АТ-пар (поли-АТ), плавился бы при $T_{\rm AT} \approx 340$ °K, полимер из одних ГЦ-пар (поли-ГЦ) — при ТГП ≈ 380 °К *), в соответствии с теорией плавления гомополимеров, изложенной выше. Возникает вопрос: как будет плавиться ДНК, в которой есть и АТ-, и ГЦ-пары? Ответ на этот вопрос зависит от характера взаимного расположения звеньев АТ и ГЦ в ДНК. Если, например, цепь составлена из больших АТ- и ГЦ-участков, то кривая плавления будет иметь вид, изображенный на рис. 14, кривая 1, — здесь независимо плавятся сначала АТ-, потом ГЦ-участки. Плавление будет носить такой характер, если длина АТ- и ГЦ-участков существенно больше средней длины расплавленного участка в гомополимере. Если в ДНК нет больших АТ- и ГЦ-участков, то она будет плавиться как целое вблизи некоторой средней между 340 и 380° К температуры. Плавление ДНК с правильным чередованием АТ- и ГЦ-звеньев, периодически повторяющиеся АТ- и ГЦ-блоки, можно рассчитать аналогично тому, как выше рассчитывалось плавление гомополимера; например, цепочка чередующихся АТ-, ГЦ-, АТ-, ГЦ-, АТ-, ГЦ-...-звеньев плавится при $T = (T_{AT} + T_{\Gamma II})/2;$ ширина интервала плавления останется весьма малой (рис. 14, кривая 2). Нас, однако, интересует реальная ДНК, последовательность АТ- и ГЦпар в которой можно считать случайной. Трудность и своеобразие задачи о вычислении термодинамических свойств такой ДНК состоит в том, что

^{*)} При так называемых стандартных условиях (SSC), когда в 1 л воды растворено 0,15 *M* NaCl.

последовательность АТ- и ГЦ-звеньев хотя и случайна, но задана определенным образом; поэтому все термодинамические характеристики ДНК должны вычисляться именно для этой последовательности звеньев. Это означает, в частности, что при нахождении статистической суммы молекулы нельзя проводить усреднение статистической суммы по всевозможным последовательностям звеньев с различной энергией разрыва (хотя

бы и сохраняя состав легкоплавких и тугоплавких пар)*); в статистической сумме нужнопроводить суммирование по фазовому пространству, сохраняя заданную последовательность АТ- и ГЦ-звеньев.

С этой точки зрения гетерополимер в растворе представляет собой систему, не находящуюся в полном термодинамическом равновесии: за время опыта, при используемых температурах, «остов» ДНК не претерпевает химических изменений — реализуются не все возможные (и обладающие разной энергией), по статической термодинамике, последовательности АТи ГЦ-звеньев в молекулах ДНК, а только одна последовательность, которая и была у ДНК, растворенной в начальный момент. Это



Рис. 14. Кривые плавления гипотетических гетерополинуклеотидов, состоящих на 50% из ГЦ-пар, при различном характере распределения пар вдоль цепи:

1 — половина молекулы — гомополимер поли-ГЦ, половина — поли-АТ; 2 — строго чередующаяся последовательность АТ- и ГЦ-пар; 3 — случайная последовательность пар оснований.

не мешает, однако, применять термодинамический подход к переходу спираль — клубок, поскольку при этом переходе рвутся или восстанавливаются слабые связи, по отношению к которым в ДНК при медленном (минуты) проведении опыта успевает установиться полное термодинамическое равновесие.

В соответствии со сказанным, плавление гетерогенной ДНК имеет другой характер, чем плавление ДНК со «скрепками» (хотя в обоих случаях имеются два типа звеньев с разными энергиями разрыва). «Скрепки», по мере плавления, перераспределяются между твердой и жидкой «фазами» ДНК, и процесс похож на плавление раствора. Гетерогенная же ДНК с заданной АТ — ГЦ-последовательностью плавится иначе: при нагревании из нее сначала выплавляются легкоплавкие (с большим содержанием АТ-пар) куски, а затем все более тугоплавкие; вид кривой плавления определяется флуктуациями АТ- и ГЦ-состава ДНК в различных ее участках. Поскольку такие флуктуации носят микроскопический характер, рассматриваемый процесс плавления гетерополимера не имеет аналогии в случае фазовых систем — макроскопически фазовая система такого рода является однородной. Таким образом, отличие задачи о плавлении

^{*)} Такое усреднение отвечает решению задачи о плавлении гомополимера со скрепками, рассмотренной в предыдущем разделе. Следуст отметить, что в некоторых работах ³⁷, ³⁸ при рассмотрении перехода спираль—клубок в гетерополимере проводилось усреднение статистической суммы по различным последовательностям звеньев. Полученные в этих работах результаты резко отличаются от результатов, полученных для гетерополимера при правильном вычислении статистической суммы. В действительности в этих работах сложным способом было проведено вычисление статистической суммы для гомополимера со скрепками, в чем можно непосредственно убедиться, сравнив результаты этих работ с результатами, полученными в работах ²², ³⁴.

гетерополимера от задач о плавлении гомополимера со скрепками особенно резко проявляется в предельном случае фазовой системы. Ниже приведены два варианта элементарной полуколичественной теории перехода спираль — клубок в гетерополимере, являющиеся модификациями рассмотрения, проведенного в работе ³⁵.

а) Начало плавления *). Рассмотрим самое начало плавления, когда из спиральной ДНК выплавляются отдельные участки и доля расплавленных звеньев мала. Условие выплавления участка гетерогенной ДНК, содержащего v звеньев и имеющего концентрацию x тугоплавких ГЦ-пар, состоит в том, что разность свободных энергий всех звеньев участка в спиральном и клубкообразном состояниях равна поверхностной энергии F_s двух границ расплавленного участка с соседними спиральными участками ДНК:

$$\mathbf{v}\left[\Delta F_{\mathrm{AT}}\left(1-x\right)+\Delta F_{\mathrm{FH}}x\right]=F_{\mathrm{s}};\tag{35}$$

здесь ΔF_{AT} — разность свободных энергий спирального и клубкооб разного состояний поли-AT в расчете на одно звено; ΔF_{AT} обра щается в нуль в точке плавления T_{AT} поли-AT и вблизи T_{AT} равна

$$\Delta F_{\rm AT} = \Delta S_{\rm AT} \left(T - T_{\rm AT} \right),$$

где ΔS_{AT} — энтропия плавления поли-AT; аналогично

$$\Delta F_{\Gamma II} = \Delta S_{\Gamma II} \left(T - T_{\Gamma II} \right).$$

Будем предполагать, что $\Delta S_{\Gamma\Pi} = \Delta S_{AT} = \Delta S$ (это несущественно, но упрощает формулы). Подставляя эти значения ΔF_{AT} и $\Delta F_{\Gamma\Pi}$ в (35) и вводя отклонение концентрации ГЦ-пар в данном участке от среднего по молекуле значения x_0 : $\Delta x = x - x_0$, найдем температуру выплавления участка с пониженной на Δx концентрацией тугоплавких ГЦ-звеньев:

$$T = T_0 + (T_{\Gamma\Pi} - T_{AT}) \Delta x + \frac{1}{\nu} \frac{F_s}{\Delta S}; \qquad (36)$$

здесь введено обозначение

$$T_0 = T_{\rm AT} \left(1 - x_0 \right) + T_{\Gamma \amalg} x_0. \tag{37}$$

Для всей молекулы v очень велико (10⁵—10⁷), так что флуктуации концентрации очень малы, и двумя последними слагаемыми в правой части (36) можно пренебречь; тогда из (36) следует, что точка плавления гетерогенной ДНК дается формулой (37), которая хорошо согласуется с экспериментальными данными (ср. с эмпирической формулой (2)).

Однако из (36) видно, что плавление ДНК начинается при более низкой температуре, чем T_0 : например, длинные участки, состоящие целиком из АТ-звеньев (x = 0, $\Delta x = -x_0$), будут выплавляться уже при температуре, удовлетворяющей неравенству $T_0 > T > T_{AT}$. Таким образом, говоря формально, мы должны считать, что плавление происходит во всем интервале $T_{AT} < T < T_{\Gamma\Pi}$ **). На самом деле таких легко-

498

^{*)} Аналогично можно рассмотреть конец плавления.

^{*)} Как следует из эмпирической формулы (2), $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT} = 36,0 - 7,04 \log [Na+],$ что для стандартных солевых условий, в которых [Na+] = 0,195, дает значение $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT} = 41^{\circ}$. В дальнейшем при расчетах и оценках используется округленное значение $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT} = 40^{\circ}$.

плавких участков мало и все плавление происходит в гораздо более узком интервале температур порядка нескольких градусов около T_0 . Оценим ширину интервала плавления (т. е. зависимость числа расплавленных звеньев от температуры).

Будем считать распределение АТ- и ГЦ-звеньев в любом участке ДНК случайным; тогда вероятность участку длиной v иметь концентрацию x = m/v ГЦ-звеньев (при средней их концентрации x_0) описывается биномиальным распределением

$$W_m = \frac{\nu!}{m! (\nu - m)!} x_0^m (1 - x_0)^{\nu - m}.$$
 (36')

Если длина выплавляющегося участка достаточно велика, т. е. $m \gg 1$ (мы увидим ниже, что при плавлении ДНК это именно так), то биномиальное распределение (36') переходит в гауссово:

$$P_{\mathbf{v}}(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \, \sigma_{\mathbf{v}}} \, e^{\frac{(\Delta x)^2}{2\sigma_{\mathbf{v}}^2}},\tag{37'}$$

где $\sigma_v^2 = x_0 (1 - x_0)/v.$

Находя из (36) флуктуацию Δx , необходимую для выплавления участка длиной ν при температуре T, и подставляя ее в (37'), получим, что вероятность участка длиной ν выплавиться из спиральной ДНК при $T < T_0$ пропорциональна *)

$$\exp\left\{-\left(\frac{T_0-T}{T_{\Gamma\Pi}-T_{AT}}\sqrt{\bar{\nu}}+\frac{F_s/\Delta S}{T_{\Gamma\Pi}-T_{AT}}\frac{1}{\sqrt{\bar{\nu}}}\right)^2/2x_0\left(1-x_0\right)\right\};\qquad(38)$$

это же выражение дает и распределение расплавленных участков ДНК по длинам.

Средняя длина расплавленного участка, как видно из (38), увеличивается при приближении к середине интервала плавления T₀:

$$\overline{\mathbf{v}} = \frac{F_s/\Delta S}{T_0 - T}.$$
(39)

Подставляя это значение в (38), находим долю расплавленных звеньев гетерогенной ДНК

$$1 - \vartheta \propto \exp\left(-\frac{T_0 - T}{\tau}\right); \tag{40}$$

здесь д-степень спиральности, а

$$\tau = \frac{1}{2} x_0 (1 - x_0) \frac{(T_{\Gamma \Pi} - T_{AT})^2}{F_s / \Delta S}.$$
 (41)

Аналогично при $T > T_0$ в области, где доля нерасплавленных участков ДНК мала, имеем вместо (40)

$$\vartheta \propto \exp\left(-\frac{T-T_0}{\tau}\right).$$
 (40')

б) Приближенное рассмотрение всей кривой илавления. Разобъем гетерополимер на одинаковые отрезки, содержащие λ пар. Если λ достаточно велико, то распределение концентрации ГЦ-пар по этим отрезкам будет описываться формулой (37') с заменой ν на λ. Поскольку распределение пар оснований предполагается случайным и отрезки не пересекаются друг с другом, корреляция между ГЦ-содержанием различных отрезков полностью отсутствует.

^{*)} Рассмотрение проводится в предположении, что доля расплавленных участков в ДНК мала, так что показатель экспоненты в формуле (38) велик; мы опускаем несущественные в этих условиях предэкспоненциальные множители.

Суммарное количество ГЦ-пар в расплавленной области будет минимальным в том случае, если расплавленными будут отрезки с концентрацией ГЦ-пар меньше некоторого граничного значения x_{λ} , а все отрезки с $x > x_{\lambda}$ будут спиральны. Величина x_{λ} определяется условием

$$\int_{0}^{x_{\lambda}} P_{\lambda}(x) dx = \frac{N_{1}}{N} .$$
(42)

Средняя концентрация ГЦ-пар в расплавленной части молекулы равна

$$\overline{x}_{1} = \frac{\int_{0}^{x_{\lambda}} x P_{\lambda}(x) dx}{\int_{0}^{x_{\lambda}} P_{\lambda}(x) dx} = \frac{N}{N_{1}} \int_{0}^{x_{\lambda}} x P_{\lambda}(x) dx.$$
(43)

Ввиду отсутствия корреляции в составе различных участков, вероятность того, что расплавленный участок состоит из k следующих друг за другом отрезков, равна просто

$$p_k = \left(1 - \frac{N_1}{N}\right) \left(\frac{N_1}{N}\right)^{k-1}.$$

Отсюда среднее число отрезков в расплавленной области

$$\overline{k} = \frac{1}{1 - \frac{N_1}{N}}$$

Следовательно, среднее число пар оснований в расплавленной области равно

$$\mathbf{v}_1 = \lambda \bar{k} = \frac{\lambda}{1 - \frac{N_1}{N}},\tag{44}$$

а число расплавленных областей во всей молекуле

$$n = \frac{N_1}{\lambda \overline{k}} = \frac{N_1}{\lambda} \left(1 - \frac{N_1}{N} \right). \tag{45}$$

Свободная энергия полимера имеет вид

$$F(N_1, N_2, n) = N_1 [\tilde{x}_1 F_1^{\Gamma \amalg} + (1 - \tilde{x}_1) F_1^{\Lambda T}] + N_2 [\tilde{x}_2 F_2^{\Gamma \amalg} + (1 - \tilde{x}_2) F_2^{\Lambda T}] + nF_s.$$

Используя условия

$$N_1 + N_2 = N, \quad \bar{x}_1 N_1 + \bar{x}_2 N_2 = x_0 N,$$

опуская в выражении для свободной энергии постоянное слагаемое и переходя от переменной *n* к переменной λ, получим

$$F(N_{i}, \lambda) = N_{i}\overline{x}_{i} \Delta F_{\Gamma II} + N_{i}(1 - \overline{x}_{i}) \Delta F_{AT} + \frac{N_{i}}{\lambda} \left(1 - \frac{N_{i}}{N}\right) F_{s}, \qquad (46)$$

где $\Delta F_{\Gamma II} = F_1^{\Gamma II} - F_2^{\Gamma II}$, аналогично для ΔF_{AT} ; \bar{x}_1 определяется формулой (43) с x_{λ} из (42).

Равновесные значения N_1 и λ находятся из условия минимума выражения (46) по обеим переменным. Для того чтобы найти среднюю длину спирального участка и ширину интервала плавления гетерополимера, следует рассмотреть выражения (42), (43), (46) в окрестности $N_1/N = 1/2$, т. е. разложить по степеням $\varepsilon = \frac{N_1}{N} - \frac{1}{2}$.

Используя формулу (37') и вновь опуская постоянные слагаемые, получим с точностью до членов второго порядка по є

$$F(N_{1}, \lambda) = N \left\{ \varepsilon \Delta F - \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \left[\frac{x_{0}(1-x_{0})}{\lambda} \right]^{1/2} (\Delta F_{\Gamma II} - \Delta F_{AT}) (1-\pi\varepsilon^{2}) + \frac{F_{s}}{4\lambda} (1-4\varepsilon^{2}) \right\}, \quad (47)$$

где $\Delta F = x_0 \Delta F_{\Gamma \Pi} + (1 - x_0) \Delta F_{AT}$. Приравнивая нулю производную по λ , получим (при $\varepsilon = 0$)

 $\lambda_0 = \frac{\pi}{2} \left(\frac{F_s}{\Delta F_{\text{TH}} - \Delta F_{\text{AT}}} \right)^2 \frac{1}{x_0 (1 - x_0)},$

откуда (см. (44)), используя равенство $\Delta F_{\Gamma\Pi} - \Delta F_{AT} = (T_{\Gamma\Pi} - T_{AT}) \frac{U_{AT}}{T_{AT}}$, находим

$$\mathbf{v}_{\mathbf{i}} = \pi \left(\frac{F_s}{T_{\Gamma \mathbf{I}} - T_{\mathbf{A}\mathbf{T}}} \right)^2 \left(\frac{T_{\mathbf{A}\mathbf{T}}}{U_{\mathbf{A}\mathbf{T}}} \right)^2 \frac{1}{x_0 \left(1 - x_0 \right)}. \tag{48}$$

Приравнивая нулю производную по ε (при постоянном λ) и дифференцируя полученное выражение по T, получим

$$\Delta T = \left(2 - \frac{4}{\pi}\right) \frac{U_{\rm AT}}{T_{\rm AT}} \frac{(T_{\Gamma II} - T_{\rm AT})^2}{F_s} x_0 (1 - x_0).$$
(49)

Рассмотрим теперь, как изменятся формулы (48) и (49), если учесть образование петель при плавлении гетерополинуклеотида. В этом случае к свободной энергии (46) следует прибавить слагаемое, описывающее энтропию петель (см. формулу (9)):

$$-T\ln\prod_{i=1}^n(\lambda k_i)^{-\alpha},$$

что дает

$$F'(N_{1}, \lambda) = F(N_{1}, \lambda) + \alpha T \frac{N_{1}}{\lambda} \left(1 - \frac{N_{1}}{N}\right) \left[\ln \lambda + \gamma \left(\frac{N_{1}}{N}\right)\right], \quad (50)$$

тде

$$\gamma\left(\frac{N_1}{N}\right) = \left(1 - \frac{N_1}{N}\right) \sum_{k=1}^{\infty} \left(\frac{N_1}{N}\right)^{k-1} \ln k.$$

Для λ₀ получим трансцендентное уравнение

$$\lambda_{0} = \frac{\pi}{2} \left[\frac{F_{s} + \alpha T \left(\ln \lambda + \gamma \left(\frac{1}{2} \right) - 1 \right)}{\Delta F_{\Gamma II} - \Delta F_{AT}} \right]^{2} \frac{1}{x_{0} \left(1 - x_{0} \right)}, \tag{51}$$

а для ΔT выражение

$$\Delta T = \left(2 - \frac{4}{\pi}\right) \frac{U_{\rm AT}}{T_{\rm AT}} \frac{(T_{\rm FII} - T_{\rm AT})^2}{F_s + \alpha T \left(\ln \lambda_0 + \gamma \left(\frac{1}{2}\right)\right)} x_0 (1 - x_0).$$
(52)

Легко убедиться в том, что $0 < \gamma\left(\frac{1}{2}\right) < 1$. С другой стороны, λ_0 составляет обычно величину порядка нескольких сотен. Поэтому величины $\gamma\left(\frac{1}{2}\right) - 1$ в формуле (51) и $\gamma\left(\frac{1}{2}\right)$ в формуле (52) дают весьма малые поправки. Таким образом, основным эффектом при учете петель является замена F_s на $F_s + \alpha T \ln \lambda_0$. При этом величина λ_0 может быть найдена по формуле (51), например методом последовательных приближений.

2. Строгая теория перехода спираль—клубок в гетерополимерах

Пусть полимер представляет собой определенную последовательность из N звеньев, причем все звенья, вообще говоря, различны. Статистическая сумма полимера имеет вид

где индекс *i* означает номер звена вдоль цепи, δ —символ Кронекера. Будем отсчитывать величины $F^{(i)}$ и $F_s^{(i)}$ от некоторых стандартных значений F и F_s ; тогда, введя обозначения

$$s = e^{\frac{F}{T}}, \quad \sigma = e^{-\frac{F_s}{T}}, \quad \zeta_i = e^{-\frac{F_s'-F_s}{T}}, \quad p_i = \zeta_i e^{\frac{F(i)-F}{T}},$$

получим выражение для матрицы $M^{(i)}$:

$$M^{(i)} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \sigma s p_i & \frac{s p_i}{\zeta_i} \end{pmatrix}.$$

Отметим, что в работе ³⁹ через p_i обозначена не величина $\zeta_{ie}^{F^{(i)}-F}$, а вели-

чина $e^{\frac{F^{(i)}-F}{T}}$, т. е. p_i/ζ_i . Новый способ определения величины p_i удобен

типа с p_i н. с. p_i с. годин способ определения дени ним p_i удосси тем, что при этом p_i не зависит от сорта соседних звеньев и характеризует только звено i.

При $N \to \infty$ величина z не зависит от состояния звеньев, находящихся на концах цепи. Поэтому к началу и концу цепи можно присоединить звенья в произвольных состояниях. Пусть эти дополнительные звенья находятся всегда в расплавленном состоянии, причем $\zeta_{N+1} = 0$. Тогда выражение для z запишется в виде

$$z = (1 \ 1) \begin{pmatrix} 1 \ 1 \\ \sigma s p_1 \ \frac{s p_1}{\zeta_1} \end{pmatrix} \cdots \begin{pmatrix} 1 \ 1 \\ \sigma s p_N \ \frac{s p_N}{\zeta_N} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}.$$

Введем вектор

$$(q_i \ f_i) = (1 \ 1) \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \sigma s p_1 & \frac{s p_1}{\zeta_1} \end{pmatrix} \cdots \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \sigma s p_i & \frac{s p_i}{\zeta_i} \end{pmatrix}, \quad i > 0,$$
$$(g_0 \ f_0) = (1 \ 1);$$

тогда

$$z = g_N. \tag{53}$$

Для определения величины ln z представим ее в виде

$$\ln z = \sum_{i=1}^{N} \ln G_i, \qquad (54)$$
$$G_i = g_i/g_{i-1}.$$

Величину G_i найдем, пользуясь уравнением

$$(g_i f_i) = (g_{i-1} f_{i-1}) \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \sigma s p_i & \frac{s p_i}{\zeta_i} \end{pmatrix},$$
(55)

откуда

$$g_{i} = g_{i-1} + \sigma s p_{i} f_{i-1}, f_{i} = g_{i-1} + \frac{s p_{i}}{\zeta_{i}} f_{i-1},$$
(56)

$$g_{i-1} = g_{i-2} + \sigma s p_{i-1} f_{i-2}, f_{i-1} = g_{i-2} + \frac{s p_{i-1}}{\zeta_{i-1}} f_{i-2}.$$
(57)

Исключая из (57) f_{i-2} и подставляя f_{i-1} из (57) в (56), получим

$$g_{i} = g_{i-1} \left(1 + \frac{s_{p_{i}}}{\zeta_{i-1}} \right) + g_{i-2} \sigma s_{p_{i}} \left(1 - \frac{1}{\sigma \zeta_{i-1}} \right) .$$
 (58)

Разделив уравнение (58) на g_{i-1}, получим

$$G_i = a_i - \frac{b_i}{G_{i-1}},\tag{59}$$

где

$$a_i = 1 + \frac{sp_i}{\zeta_{i-1}}, \quad b_i = \sigma sp_i \left(\frac{1}{\sigma \zeta_{i-1}} - 1\right).$$

Степень спиральности вычисляется по формуле

$$\vartheta = \frac{1}{N} \frac{\partial \ln z}{\partial \ln s}.$$
 (60)

Подставив (54) в (60), получим

$$\vartheta = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} Q_i, \tag{61}$$

где $Q_i = \frac{\partial \ln G_i}{\partial \ln s}$. Прямым дифференцированием находим

$$Q_{i} = \frac{1}{G_{i}} \left\{ G_{i} - 1 + \frac{b_{i}}{G_{i-1}} Q_{i-1} \right\}.$$
 (62)

Количество *n* областей, все звенья которых находятся в состоянии 2, определяется формулой

$$n = \frac{\partial \ln z}{\partial \ln \sigma} \,. \tag{63}$$

При этом средняя длина спиральной области равна $v = \vartheta N/n$. Подставив (54) в (63), получим

$$n = \sum_{i=1}^{N} R_i, \tag{64}$$

где $R_i = \frac{\partial \ln G_i}{\partial \ln \sigma}$. Прямым дифференцированием находим

$$R_{i} = \frac{1}{G_{i}G_{i-1}} (c_{i} + b_{i}R_{i-1}), \tag{65}$$

где $c_i = \sigma p_i s$.

Рекуррентные формулы (59), (61), (62), (64), (65), полученные в работе ³⁹, весьма удобны для прямых расчетов кривых плавления на счетной машине. Аналогичный, но несколько более сложный метод численного решения задачи был предложен в работе ⁴⁰ (см. также ⁴¹). В более

503

поздних работах ^{42, 43} статистическая сумма вычислялась путем прямого перемножения матриц. Результаты расчетов, выполненных в перечисленных работах, совпадают *). Наиболее простыми и удобными для численных расчетов являются формулы (59), (61), (62), (64), (65), так как при этом задача сводится к элементарным рекуррентным формулам и устраняются затруднения, возникающие при перемножении матриц или при численном дифференцировании. Отметим, что совсем недавно рассматриваемая задача была еще раз обсуждена в работе ⁴⁴.

Точное проведение учета петель при рассмотрении перехода спираль — клубок в гетерополимере весьма затруднительно и до сих пор отсутствует. Приближенный метод решения этой задачи, базирующийся на изложенной выше теории, предложен в работе ⁴⁵.

Как уже отмечалось при рассмотрении гомополимера, учет петель приводит к появлению перед членом статистической суммы, отвечающем nрасплавленным областям с длинами v_1, \ldots, v_n , множителя

$$J = \prod_{i=1}^{n} v_i^{-3/2}.$$
 (66)

Для вычисления такой статистической суммы матричным методом степенная зависимость v^{α} заменяется экспоненциальной q^{ν}/μ так, чтобы при средней длине расплавленной области $\overline{v_1}$ совпадали сами величины и значения первых производных этих двух функций. Эти условия приводят к формулам для q и μ

$$q = e^{\frac{\alpha}{\tilde{v}_1}}, \tag{67}$$

$$\mu = \frac{1}{\bar{v}^{\alpha}} e^{\alpha}.$$
 (68)

При этом степень спиральности ϑ вычисляется по формулам (59), (61), (62), а средняя длина расплавленной области $\overline{v_1}$ — по формулам (59), (64), (65) при учете того, что $\overline{v_1} = (1 - \vartheta) N/n$, с заменой во всех формулах величины *s* на *qs*, а σ на $\mu\sigma$. Для получения истинных значений ϑ и $\overline{v_1}$ проще всего воспользоваться методом последовательных приближений. Начав с произвольных значений *q* и μ и вычислив $\overline{v_1}$, по формулам (67), (68) вычисляются новые значения *q* и μ , по которым вновь вычисляется $\overline{v_1}$, и т. д., пока получаемые на следующем шаге процедуры значения не перестанут отличаться от полученных на предыдущем шаге. Обоснование этой процедуры вычисления дано в работе ⁴⁵.

а) А палитическое решение 46 . Величину G можно рассматривать в качестве случайной величины и ввести ее функцию распределения P(G), определенную как

$$P(G) = \frac{1}{N} \sum_{k} \delta(G - G_{k}).$$
⁽⁶⁹⁾

В случае звеньев двух сортов из рекуррентной формулы (59) следует уравнение для функции P(G)

$$\underline{P(G)} = x_1 \frac{b_1}{(a_1 - G)^2} P\left(\frac{b_1}{a_1 - G}\right) + x_2 \frac{b_2}{(a_2 - G)^2} P\left(\frac{b_2}{a_2 - G}\right), \tag{70}$$

504

^{*)} В работах ⁴², ⁴³ метод вычисления статистической суммы путем прямого перемножения случайной последовательности матриц именуется методом Монте-Карло. Такая терминология является неверной и вводящей в заблуждение. В действительности метод Монте-Карло нигде в подобных расчетах не используется, а введение случайной последовательности звеньев является необходимостью, связанной с незнанием истинной последовательности.

где x_1 и x_2 — доли звеньев сорта 1 и 2 в гетерополимере ($x_1 + x_2 = 1$). Статистическая сумма выражается через P(G) следующим образом (см. (54)):

$$\ln z = N \int P(G) \ln G \, dG. \tag{71}$$

Точное аналитическое решение уравнения (70) найти не удалось. Аналитические выражения для искомых величин найдены в предположении, что

$$\frac{1}{2} \frac{F_s}{\Delta S} \gg T_{\Gamma II} - T_{AT}.$$
(72)

При этом оказывается ⁴⁶, что степень спиральности д зависит от температуры следующим образом:

$$\vartheta = \frac{1}{2} - \frac{\mathrm{sh}\,2\xi - 2\xi}{4\,\mathrm{sh}^2\,\xi}, \quad \xi = \frac{T - T_0}{2\tau}, \tag{73}$$

где т дается формулой (41); в точке плавления

$$\bar{\mathbf{v}} = \frac{(F_s/\Delta S)^2}{(T_{\Gamma\Pi} - T_{AT})^2} \frac{1}{x_0 (1 - x_0)}.$$
(74)

При понижении температуры $\xi = \frac{T - T_0}{2\tau} \rightarrow -\infty, \quad \vartheta \rightarrow 1 + 2\xi e^{2\xi}$, так что $1 - \vartheta = \frac{T_0 - T}{\tau} e^{\frac{T - T_0}{\tau}}$, что находится в соответствии с формулой (40), полученной при качественном рассмотрении.

лученной при качественном рассмотрении. При $\xi \to 0$ из (73) получаем $\vartheta = \frac{1}{2} - \frac{\xi}{3}$; отсюда следует, что точки пересечения предельных значений степени спиральности $\vartheta = 0$ и $\vartheta = 1$ касательной к кривой плавления в середине интервала плавления отстоят друг от друга на расстояние $\xi_0 - \xi_1 = 3$, т. е. ширина интервала плавления, определенная с помощью касательной к кривой плавления при $\vartheta = 1/2$, равна

$$\Delta T = 2 \left(\xi_1 - \xi_0\right) \tau = 6\tau, \tag{75}$$

где т дается формулой (41).

Таким образом, строгая теория подтверждает правильность изложенной выше качественной картины перехода спираль — клубок в гетерогенной ДНК, основанной на представлении о последовательном выплавлении (по мере повышения температуры и приближения к середине интервала плавления) все более крупных участков ДНК, обогащенных все меньше и меньше легкоплавкой АТ-компонентой. Элементарная теория и приближенная аналитическая дают одинаковые зависимости ΔT и \overline{v} от всех параметров. Однако все эти формулы получены при использовании различных приближений. Поэтому большой интерес представляют результаты точных расчетов, которые были проведены на основе рекуррентных формул (59), (61), (62), (64), (65).

б) Машинные расчеты перехода спираль клубок в гетерополимере и их сравнение с опытом. В настоящем разделе изложены результаты, полученные в работах ^{39, 45, 47}. В качестве независимых параметров в расчете были приняты: доля ГЦ-пар x_0 в ДНК, температура плавления $T_{\rm AT}$ и $T_{\rm ГЦ}$ соответствующих гомополимеров, теплота плавления $U_{\rm AT}$ и фактор кооперативности σ . Расчеты проводили с помощью электронно-вычислительных машин М-20 и М-220. При расчете для заданного x_0 строилась последовательность случайно чередующихся нуклеотидных пар общим количеством N, причем вероятность встречи АТ-пары принималась равной $1 - x_0$, а ГЦ-пары — x_0 .

8 УФН, том 105, вып. 3

Рассмотрим сначала результаты для случая плавления без возникновения петель. При заданных параметрах производились вычисления степени спиральности д по формулам (59), (61), (62), средней длины спиральных областей по формулам (59), (64), (65) и ширины интервала плавления



Рис. 15. Кривые плавления однонитевого гетерополимера со случайной последовательностью ³⁹ (σ = 5 · 10⁻⁵).

 $\begin{array}{l} 1 & -x_0 = 0, \ T_0 = 340 \ ^\circ \mathrm{K}, \ N = 2 \cdot 10^4; \ 2 - x_0 = 0, 1, \\ T_0 = 344 \ ^\circ \mathrm{K}, \ p = 3, 310, \ N = 4 \cdot 10^4; \ 3 - x_0 = 0, 5, \\ T_0 = 360 \ ^\circ \mathrm{K}, \ p = 3, 138, \ N = 6 \cdot 10^4. \end{array}$

по формуле (1). Величина $\left| \frac{\partial \vartheta}{\partial T} \right|$ вычислялась по рекуррентным формулам ³⁹

$$\left|\frac{\partial \vartheta}{\partial T}\right| = \left|\frac{\partial \vartheta}{\partial \ln s}\right| \frac{U_{\rm AT}}{T^2}, \quad (76)$$

где

 S_i

$$\frac{\partial \vartheta}{\partial \ln s} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} S_i, \qquad (77)$$
$$= Q_i \left(1 - Q_i\right) + \frac{b_i}{G_i G_{i-1}} \times$$

$$\times [Q_{i-1}(1-Q_{i-1})+S_{i-1}].$$
(78)

Расчет позволил получить кривые плавления, среднюю длину спирального участка полимера при различных значениях перечисленных выше параметров. Соответствующие примеры приведены на рис. 15, 16 и 17. Кривые

на этих рисунках построены для близких к реальным значений параметров: $T_{\rm AT} = 340$ °K, $T_{\rm PII} = 380$ °K, $U_{\rm AT} = 7$ ккал/моль (3500 °K), $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$. Количество звеньев расчетной цепочки N в разных сериях вычислений бралось от 2·10⁴ до 10⁶. Указанный на рис. 17 разброс теоретических точек (среднеквадратичное отклонение) отвечает тому, что генерируемые при расчете цепи с одинаковым составом различаются по последовательности. В помеченный интервал укладывается 68% всех случаев. Этот разброс обращается в нуль лишь при $N \rightarrow \infty$. Нуклеотидный состав генерируемых при расчете цепей при взятых значениях N различается незначительно и не может дать подобный разброс значений ΔT (при $N = 10^5$ он может дать в области $x_0 = 0.5$ разброс значений ΔT не более 10⁻⁴ °C). В этом смысле не следует делать различий между априорным и апостериорным составом цепей, и замечание, сделанное по этому поводу в работе ⁴¹, в данном случае несущественно. Различие же в нуклеотидной последовательности разных молекул ДНК при заданном составе, как мы видим, может приводить к различиям в ΔT порядка 0,2-0,3 °C (при $N = 10^5$; с ростом N эта величина падает как $1/\sqrt{N}$). Для того чтобы вычислять в случае надобности ширину интервала плавления при различных значениях параметров, удобно пользоваться следующей интерполяционной формулой, удовлетворяющей результатам машинного расчета47:

$$\Delta T \approx 2.16 \frac{T_0^2}{U_{\rm AT}} \left(\frac{T_{\rm FII} - T_{\rm AT}}{T_{\rm AT} T_0} U_{\rm AT} \right)^{1.6} \frac{x_0 (1 - x_0)}{\lg \frac{1}{\sigma}} + 4 \sqrt{\sigma} \frac{T_{\rm AT}^2}{U_{\rm AT}}.$$
 (79)

Температура плавления T_0 удовлетворяет, согласно машинным расчетам, формуле (37). Формула (79) справедлива в широком интервале значений параметров и имеет точность не хуже 10%. Эта точность сохраняется в интервале изменения значений: параметра x_0 от ≈ 0.15 до ≈ 0.85 , $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT}$ — по крайней мере в пределах от 20 до 100°, σ — от 10⁻³ до нуля; для U_{AT} может быть использовано практически любое положительное значение. Естественно, что не все допустимые значения параметров имеют реальный смысл и конкретный выбор параметров определяется данными опыта.

Интересно сравнить формулу (79) с формулами, полученными выше при приближенном анализе. Мы видим, что в том случае, когда гетерогенность является определяющей (первое слагаемое в формуле (79) значи-



Рис. 16. Зависимость средней длины расплавленных участков от доли расплавленных звеньев для однонитевого гетерополимера со случайной последовательностью³⁹. Кривые 1—3 отвечают тем же значениям параметров, что и соответствующие кривые рис. 15.

тельно превосходит второе), формула (79) дает такую же зависимость от x_0 и от σ , как и формулы, полученные выше, но степень при $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT}$ равна не 2, а 1,6. Таким образом, приближенная теория не только правильно отражает основные



Рис. 17. Зависимость ширины интервала плавления однонитевого гетерополимера со случайной последовательностью от ГЦсодержания ³⁹.

Указаны величины среднеквадратичного отклонения.

качественные особенности илавления гетерополимера, но и дает количественно верный результат для зависимости ΔT от σ в области малых σ . В области реальных значений σ второе слагаемое в формуле (79) дает вклад в ΔT около 1°. Отметим, кстати, что формула (79) остается справедливой при переходе от гетерополимера к гомополимеру (ср. с формулой (8)).

Сравнение изложенных результатов расчета для случая плавления без образования петель с данными опыта будет проведено ниже, при обсуждении плавления замкнутых кольцевых ДНК. Здесь же для сравнения с опытом следует сначала привести результаты расчета для плавления с образованием петель.

С помощью итерационной процедуры, описанной выше, при тех же значениях параметров, для которых были проведены расчеты, результаты которых изображены на рис. 15—17, были рассчитаны кривые плавления ДНК с учетом образования петель. Эти кривые изображены на рис. 18. Ширина интервала плавления для этих кривых получилась равной: $\Delta T = 2.7^{\circ}$ при $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$ и $\Delta T = 3.2^{\circ}$ при $\sigma = 5 \cdot 10^{-4}$. Без учета петель вместо этих значений получались значения $\Delta T = 7 - 8^{\circ}$ (по формуле (79)). Это сужение интервала плавления находится в соответствии с формулой (52).

Если для U_{AT} принять значение 9 ккал/моль, что, по-видимому, ближе к истине, чем значение 7 ккал/моль, то величина ΔT несколько увеличивается, достигая значения $\approx 3^{\circ}$ при $\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$.

Итак, результаты расчетов ширины интервала плавления гетерополинуклеотидов со случайной последовательностью с учетом образования петель приводят к величине $\Delta T = 2.8 - -3.2^{\circ}$ в области реальных значений параметров.



Рис. 18. Кривые плавления двунитевого гетерополимера со случайной последовательностью ⁴⁵. 1 — σ = 5·10⁻⁵; 2 — σ = 5·10⁻⁴.



Рис. 19. Зависимость средней длины спирального участка от степени спиральности. Кривые — теоретические, рассчитанные для двунитевого гетерополимера со случайной последовательностью 45 : $I - \sigma = 5 \cdot 10^{-5}$, $U_{AT} = 7 ккал/моль; 2 -$ $<math>\sigma = 5 \cdot 10^{-5}$, $U_{AT} = 9 ккал/моль. Точки — экспери$ ментальные значения для ДНК фага T2 ^s.

На рис. 19 приведены расчетные кривые зависимости средней длины спирального участка от степени спиральности для двух крайних значений U_{AT}.

Полученные результаты согласуются с результатами расчетов Крозерса ⁴⁸, выполненных другим методом. В работе Крозерса, однако, расчеты проводились для довольно малых значений длины цепи N (5000), причем для упрощения вычислений было предположено, что плавление может происходить только участками в несколько десятков звеньев (от 30 до 50). В связи с этим результаты работы ⁴⁸ были подвергнуты серьезной критике Эйхингером и Фиксманом ⁴⁹. Фиксман с сотрудниками ^{49, 50} предложили в свою очередь весьма искусственный и не имеющий сколько-нибудь надежного обоснования метод расчета перехода спираль — клубок в гетерополимерах. Единственным обоснованием служит то, что проведенные ими расчеты для однонитевых гетерополимеров хорошо согласуются в некоторой области значений параметров с результатами строгой теории (см. ⁵⁰). Однако результаты для двунитевого гетерополимера резко расходятся с приведенными выше для этого случая и дают ширину интервала плавления около 0,2°. Изложенная выше элементарная теория ясно показывает, что учет петель в гетерополимере не может дать таких огромных эффектов. Поэтому результаты работы ⁴⁹ являются, на наш взгляд, ошибочными.

Перейдем к сравнению теории с опытом. К сожалению, единственной экспериментально измеряемой характеристикой до последнего времени являлась кривая плавления. Форма кривой плавления согласуется с экспериментом почти независимо от расчетной модели и не может служить критерием правильности теории. Поэтому сравнивать имеет смысл только численную величину ширины интервала плавления. В настоящее время имеются достаточно полные экспериментальные данные для двух условий: стандартных ионных условий SSC и для 7,2 *М*-ного раствора NaClO₄. В первом случае $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT} = 41^\circ$, во втором 56°. Остальные параметры меняются сравнительно слабо. Сравнение теории с экспериментом приведено в таблице. Данные для ДНК фага T2 получены в работе ⁴, остальные данные взяты из работы ¹². ДНК фагов T2 и T7 являются линейными, ДНК полиомы II является кольцевой, но с разрывом в одной из цепей, так что ее нити могут свободно раскручиваться, и поэтому она должна подчиняться теории. Чимеров.

днк	ΔT _{əксп}	$\Delta T_{\rm reop}$	днк	ΔT _{эксп}	ΔT _{reop}
SSC (0, 15 <i>M</i> NaCl), $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT} = 41^{\circ}$			7,2 <i>M</i> NaClO ₄ , $T_{\Gamma\Pi} - T_{AT} = 56^{\circ}$		
Т2 Т7 Полиома II Полиома I	$3,2^{\circ}$ 2,5–3° 2,5–3° –	$\left.\right\}_{\substack{2,8-3,2^{\circ}\\\approx8^{\circ}}}$	Т2 Т7 Полиома II Полиома I	5° 5.5° 8° 19°	$\left.\begin{array}{c} 4,8-5,2^{\circ}\\ \approx 14^{\circ}\end{array}\right.$

Сравнение теории с экспериментом

Теория, предсказывающая ширину интервала плавления, содержит единственный «чисто теоретический» параметр σ . Все остальные параметры определены непосредственно из независимых опытов (калориметрия и определения T_m). Заметим, что, в то время как ΔT для гомополинуклеотида сильно зависит от σ (степенным образом), в случае гетерополинуклеотида эта зависимость значительно более слабая (логарифмическая). Поэтому выбор σ имеет смысл делать из сравнения теории с опытом для гомополинуклеотидов, что, как было указано выше, дает значение $10^{-4}-10^{-5}$. При этом, естественно, остается некоторая неопределенность, о чем говорилось выше в разделе, посвященном пдавлению гомополимеров, однако вследствие логарифмической зависимости параметров плавления гетерополимера от σ эта неопределенность вряд ли может заметно повлиять на результат.

Полученное согласие экспериментальных и расчетных значений ΔT следует признать вполне удовлетворительным. В 7,2 *М*-ном растворе NaClO₄ экспериментальные данные для ДНК полиомы оказались существенно больше теоретических. Здесь имеется внутреннее противоречие в экспериментальных данных, так как в условиях SSC фаг T7 и ДНК полиомы II имеют одинаковые значения ΔT , а в 7,2 *М*-ном растворе NaClO₄ — разные. В связи с этим некоторому расхождению между теорией и опытом не следует пока придавать серьезного значения.

Большой интерес представляет сравнение теории с другими экспериментально найденными характеристиками перехода спираль — клубок в ДНК. На рис. 19 нанесены экспериментальные данные, полученные в работах^{4,5} (точки). Как видим, результаты расчетов для различных возможных значений параметров ($U_{\rm AT}$ от 7 до 9 ккал/моль) берут экспериментальные точки «в клещи». Поскольку v несколько сильнее зависит от σ , чем ΔT (см., например, формулы (48), (74)), сравнение экспериментальных значений v с теоретическими позволяет в принципе дополнительно уточнить выбор σ . Результаты такого сравнения свидетельствуют в пользу выбора значений σ около 5·10⁻⁵.

Полученное согласие теории с опытом указывает на то, что некоторые ДНК, в частности особенно хорошо изученная экспериментально ДНК фага Т2, имеют последовательность пар оснований, которая при разбиении ее на участки в сотни звеньев, ведет себя так же, как случайная последовательность, которая принималась при теоретических расчетах. Однако такого рода ДНК, имеющие узкий интервал плавления (около 3°), представляют собой скорее исключение, чем правило. Уже среди вирусов имеются такие, чья ДНК состоит из длинных участков, сильно отличающихся по среднему ГЦ-содержанию. Эти ДНК плавятся ступенчато: каждая ступенька отвечает плавлению отдельного участка — блока. ДНК из высших организмов имеет ходя и достаточно плавные, но очень широкие кривые плавления, с $\Delta T = 10^\circ$. Недавно было показано, что это объясняется блочным характером распределения пар оснований ДНК высших организмов ^{51, 52}. ДНК высших организмов можно, в первом приближении, считать последовательностью блоков среднего размера около 10⁴—10⁵ пар, внутри которых последовательность пар оснований близка к случайной с заданным значением x₀, но значение x₀ различно для разных блоков. Аналогичное строение имеют ДНК бактерий, но у них блоки меньше отличаются друг от друга по среднему ГЦ-составу и поэтому для них ΔT имеет меньшее значение *).

3. Зависимость ширины интервала плавления ДНК от длины цепи

Рассмотренные до сих пор результаты относились к плавлению длинных молекул, в которых концевые эффекты не сказываются. Уменьшение длины цепи приводит к понижению температуры плавления и расширению интервала плавления в случае как гомо-, так и гетерополимера. Этот эффект особенно отчетливо проявляется, когда длина цепи становится значительно меньше средней длины спирального участка, образующегося в ходе плавления полимера. В этом случае можно считать, что плавление таких фрагментов происходит целиком без образования промежуточных состояний. Плавление короткого фрагмента облегчено тем, что он имеет поверхностную энергию, равную энергии двух границ F_s в полимере, так что условие райновесия имеет вид (ср. с формулой (35))

$$\mathbf{v}\Delta F = -F_s,\tag{80}$$

где ΔF — разность свободных энергий спирального и клубкообразного состояний длинного полимера в расчете на одно звено. Так как $\Delta F = -U + T\Delta S$, $U/\Delta S = T_0$ — температура плавления длинного

^{*)} Приведенные результаты делают особенно очевидной несостоятельность сделанной в работе ⁴¹ попытки объяснить различные значения ΔT для ДНК из разных источников путем произвольной подгонки параметра σ (который пришлось менять при этом на несколько порядков) в рамках расчетов перехода спираль — клубок для гетерополимера со случайной последовательно**с**ыю, без учета петель.

полимера, то температура плавления фрагмента длины v равна

$$T_m = T_0 - \frac{F_s}{\Delta S} \frac{1}{\nu}.$$
 (81)

Формула (81) справедлива как для гомо-, так и для гетерополимера. Кривая плавления раствора фрагментов длины v будет описываться законом действующих масс (распределение Больцмана):

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{F_2 - F_1}{T}} = e^{-\frac{\nu\Delta F + F_s}{T}},$$
$$\hat{\upsilon} = \frac{1}{1 + e^{\frac{\nu\Delta F + F_s}{T}}}.$$
(82)

откуда

Таким образом, температура плавления (81) отвечает точке, в которой $\vartheta = 1/2$, а ширина интервала плавления имеет вид

$$\Delta T = \frac{4}{\nu} \frac{T_0}{\Delta S} = \frac{4}{\nu} \frac{T_0^2}{U} \,. \tag{83}$$

Эта формула, очевидно, справедлива только для гомополимера или для препарата. состоящего из молекул гетерополимера, имеющих строго одинаковую последовательность (см. примечание 7).

При фрагментации длинной молекулы гетерополимера, имеющей случайную последовательность, различные фрагменты имеют концентрацию ГЦ-пар, отличную от средней x_0 на величину Δx , имеющую гауссово распределение (37'). Связь между температурой плавления фрагмента T и величиной Δx дается формулой (ср. с формулой (36))

$$T = T_0 + (T_{\Gamma\Pi} - T_{\Lambda T}) \Delta x - \frac{F_s}{\Delta S} \frac{1}{\nu}.$$
(84)

Следовательно, кривая плавления будет иметь форму кривой ошибок:

$$\vartheta = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma_{\nu}} \int_{\Delta x(T)}^{\infty} e^{-\frac{t^2}{2\sigma_{\nu}^2}} dt, \qquad (85)$$

где Δx (*T*) дается формулой (84). Из формулы (85) получаем, используя определение (1):

$$(\Delta T)^2 = 2\pi \left(T_{\Gamma II} - T_{AT}\right)^2 x_0 \left(1 - x_0\right) \frac{1}{\nu}.$$
(86)

Таковы элементарные асимптотические (при малых v) формулы для зависимости температуры и ширины интервала плавления от длины цепи. Эти формулы оказываются весьма полезными для грубых оценок самого разного сорта (см., например, ⁵³). Однако они не могут претендовать на количественное описание эксперимента, особенно в случае гетерополимеров.

Первая попытка построения количественной теории для зависимости кривых плавления фрагментированной ДНК от длины цепи и ее сравнения с опытом была сделана в работе ⁵⁴. В этой работе было показано, что количественное сравнение с опытом температуры плавления затруднено тем, что эта характеристика чувствительна к тому, происходит ли полное расхождение нитей при плавлении. В остальном эта работа не является убедительной, так как проведенные в ней численные расчеты относились лишь к предельному случаю малых длин и сравнивались с экспериментом для больших длин (> 400 звеньев), при которых ширина интервала плавления фрагментированной ДНК мало отличалась от ширины интервала плавления высокомолекулярной ДНК. Следует отметить также, что эксперименты, проведенные в работе ⁵⁴, имеют слишком низкую точность для того, чтобы можно было проводить их количественное сравнение с теорией.

Расчеты кривых плавления фрагментированных молекул могут быть проведены с помощью общих формул (59), (61), (62). Разрыв цепи из Nзвеньев на куски, содержащие по n_0 звеньев, осуществляется в теории путем задания условия (предполагается, что $N = n_0 k_0$)

$$\zeta_i = \begin{cases} 1 & \text{при} \quad i \neq k n_0, \\ 1/\sigma & \text{при} \quad i = k n_0, \end{cases} \quad k = 1, \ 2, \ \dots, \ (k_0 - 1). \tag{87}$$

Это условие означает разрушение взаимодействия между звеньями с номерами kn_0 и $kn_0 + 1$. На опыте такой разрыв взаимодействия может быть осуществлен как истинной фрагментацией ДНК, так и образованием в ней тем или иным способом локально денатурированных участков. На рис. 20 приведены рассчитанные по формулам (59), (61), (62) и (87) кривые плавления для разных значений n_0 . Мы видим, что по мере уменьшения n_0 происходит закономерный сдвиг кривых влево и их расширение. Поскольку расчеты проводились в предположении, что полного расхождения нитей при плавлении не происходит, не приходится ожидать хоро-



Рис. 20. Теоретические кривые плавления гетерополимера со случайной последовательностью, «фрагментированного» до различных значений n_0 ⁵⁵:

 $I - n_0 = 3 \cdot 10^5;$ $2 - n_0 = 200;$ $3 - n_0 = 100;$ $4 - n_0 = 50.$

шего согласия рассчитанных таким образом значений сдвига температуры плавления с экспериментом. Это связано с тем, что сдвиг температуры плавления, как отмечалось выше, зависит от того, происходит ли полное расхождение нитей. Напротив, изменение ширины интервала плавления не должно зависеть от этих факторов. Более того, расчеты показывают 55, что величина

$$\delta (\Delta T)^2 \equiv (\Delta T)^2 - (\Delta_0 T)^2, \quad (88)$$

где $\Delta_0 T$ — асимптотическое значение ширины интервала плавления, при $n_0 \rightarrow \infty$ практически не зависит от принятого в расчете значения фактора кооперативности σ . Поскольку переход от модели однонитевого гетеро-

полимера к модели двунитевого гетерополимера эквивалентен в теории изменению эффективного значения σ , рассчитанные значения δ $(\Delta T)^2$ не должны зависеть от модели. Наконец, расчеты показали ⁵⁵, что величина δ $(\Delta T)^2$ не зависит практически от характера распределения фрагментов по длинам. Исходя из результатов машинных расчетов была выведена интерполяционная формула ⁴⁷

$$\frac{100}{n_0} \approx (0.87y + 0.20) \frac{y}{y + 0.074},$$
(89)

где y — величина, связанная с $\delta(\Delta T)^2$:

$$\delta \,(\Delta T)^2 \approx 0.103 \left(\frac{T_0^2}{U_{\rm AT}}\right)^2 \left(\frac{T_{\rm FII} - T_{\rm AT}}{T_0 T_{\rm AT}} \,U_{\rm AT}\right)^{1,4} x_0 \,(1 - x_0) \,y \,. \tag{90}$$

Эта формула может быть сопоставлена с опытом. В работе ¹³ были получены кривые плавления ДНК, фрагментированной до различного молекулярного веса (см. рис. 9). Вид кривых на рис. 9 качественно совпадает с тем, что предсказывается теорией. Правда, подъем левой ветви

кривых по мере уменьшения молекулярного веса превышает ожидаемый, что связано, по-видимому, с нестрого поперечным разрывом молекул при фрагментации, приводящим к образованию однонитевых «хвостов» на концах фрагментов. На рис. 21 приведена зависимость $\delta (\Delta T)^2$ от $1/n_0$. Величина n_0 определялась седиментационным методом и с помощью электронного микроскопа.

Кружочки на рис. 21— эксперимент, штриховая линия построена по формуле (89) со значениями параметров, отвечающими стандартным ионным условиям. Мы видим, что теория согласуется с экспериментом. Таким образом, измерение ширины



Рис. 21. Теоретическая (штриховая линия) и экспериментальная (кружочки) зависимости δ (ΔT)² от 1/ n_0 .

интервала плавления может использоваться для определения длины цепи фрагментированной ДНК. Более того, так как эффект уширения кривой плавления связан с нарушением взаимодействия между звеньями вдоль цепи, а не с собственно разрывом сахаро-фосфатного остова, измерение ширины интервала плавления может служить универсальным методом определения концентрации дефектов вторичной структуры ДНК. Такой метод был предложен в работе¹³, и его возможности были продемонстрированы на примере ДНК, подвергнутой действию ультрафиолетового излучения, которое вызывает в ДНК дефекты вторичной структуры без разрыва сахаро-фосфатного остова.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из всего сказанного можно видеть, что явление перехода спираль клубок в ДНК принадлежит к числу физических явлений, поддающихся уже в настоящее время детальному теоретическому и экспериментальному анализу. Проведенные исследования показывают, что в случае природных ДНК мы имеем дело с реальным одномерным апериодическим кристаллом. Синтетические гомополинуклеотиды представляют собой периодические кристаллы. Каковы дальнейшие задачи теоретического и экспериментального исследования перехода спираль - клубок в ДНК? Прежде всего необходимо отметить недостаток сведений о свойствах синтетических гомополимеров. Это связано прежде всего с малой доступностью препаратов гомополинуклеотидов высокого молекулярного веса. Проведение систематических и тщательных исследований синтетических гомополинуклеотидов существенно ускорило бы прогресс в этой области. Необходимо также проведение тщательных измерений кривых плавления реальных ДНК в различных ионных условиях с целью получения количественных данных о зависимости ΔT от условий среды. Оно позволило бы дополнительно более детально сравнить теорию с опытом.

Что касается теории, то здесь основная трудность связана с вопросом об узлах в расплавленной области полимера. В этом пункте теория иерехода спираль — клубок оказывается перед трудностями, во многом аналогичными тем, которые стоят перед другими областями физики полимеров (см., например, ⁵⁶⁻⁵⁸).

В настоящей статье мы ограничились рассмотрением термодинамики перехода спираль — клубок в ДНК. В последние годы интенсивно ведется исследование кинетики этого процесса (см. ⁵⁹⁻⁶¹). Уже получен ряд интересных экспериментальных результатов, но адекватная теория явления пока отсутствует.

Другим интересным направлением, развивающимся в последние годы, является исследование кинетики расплетания ДНК под действием химических агентов, реакция оснований с которыми приводит к невозможности образования ими комплементарных пар. Таким агентом является, в частности, формальдегид. Кинетика расплетания ДНК под действием формальдегида изучена в настоящее время довольно детально, и на основе ее изучения разработан весьма чувствительный метод регистрации локально денатурированных участков в ДНК (см. ^{62, 27, 63}). Этот метод сам по себе, а также в комбинации с некоторыми приемами, основанными на термодинамических свойствах ДНК, позволяет получить результаты, которые могут представлять непосредственный биологический интерес ^{53, 63, 64}.

Целью настоящей статьи является изложение существующих теоретических представлений о термодинамических свойствах ДНК как одномерного апериодического кристалла. Изучение перехода спираль — клубок в ДНК интересно само по себе, так как мы имеем здесь дело с необычным физическим явлением. В последнее время, однако, становится все более очевидной важность всестороннего изучения термодинамических свойств ДНК, и в особенности ее комплексов с белками, для понимания того, как происходят основные этапы функционирования ДНК в клетке. Пожалуй, наиболее интересной в этом плане является работа Альбертса и Фрей 65. В этой работе выделен белок гена 32 бактериофага Т4, присутствие которого в больших количествах необходимо для нормального протекания процесса репликации (удвоение ДНК) и генетической рекомбинации. Исследования, проведенные в работе 65, показали, что этот белок обладает на много большей константой связывания с однонитевой ДНК, чем с двунитевой молекулой. Следовательно, присутствие этого белка в растворе должно существенно облегчать разделение нитей ДНК. Непосредственно расплетающее действие белка было доказано при его взаимодействии с синтетическим двунитевым полинуклеотидом поли-(dAT : dAT). Был исследован еще ряд интересных свойств этого белка. Таким образом, в клетке существуют специальные белки, осуществляющие разрушение (или очень сильное ослабление) спиральной структуры ДНК, и это разрушение необходимо для функционирования клетки.

Исследования в этом направлении только начинаются, однако уже сейчас ясно, что они приведут к значительно более глубокому пониманию того, как ДНК осуществляет свои функции в клетке.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Структура молекулы ДНК установлена исходя из данных рентгеноструктурного анализа и стереохимических соображений Уотсоном и Криком в 1953 г. В дальнейшем справедливость модели Уотсона — Крика была строго доказана Уилкинсом с сотрудниками на основе гораздо более полных рентгеноструктурных данных. Установление этой структуры признано самым крупным достижением XX века в области биологии (история открытия структуры ДНК живо описана в книге Дж. Уотсона ⁶⁶). Это открытие положило начало новой науке — молекулярной биологии.

Указанные в тексте параметры имеет так называемая *В*-форма ДНК. При спльном изменении внешних условий ДНК может менять структуру. Так, например, при высушивании препарата ДНК происходит переход ее в *А*-форму, в которой ДНК содержит 11 пар оснований на виток спирали и нормаль к плоскости пар оснований

отклонена от оси спирали на 20°. При повышенной влажности ДНК находится в В-форме, и поэтому полагают, что такую же структуру имеет ДНК в разбавленном растворе. Справедливость этого предположения подтверждается рядом косвенных данных (двоейное лучепреломление в потоке, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, оптический дихроизм и т. д.). Недавно получены наиболее убедительные данные такого рода (см. 67). Показано, что спектр кругового дихроизма ДНК в растворе совпадает со спектром пленки ДНК при высоких значениях относительной влажности, когда ДНК, согласно рентгеноструктурным данным, находится в В-форме. При понижении влажности, когда ДНК переходит в А-форму, наблюдается резкое изменение спектра кругового дихроизма.

В последнее время накапливаются сведения о том, что при изменении свойств раствора (температуры, концентрации солей) возможны небольшие изменения струк-

раствора (температуры, концептрация солон, возложные оснований). туры ДНК (например, угла между соседними парами оснований). 2. Для изучения свойств молекул ДНК их выделяют из клеток или вирусов болгов). Используемые обычно иутем очистки от всех других компонентов (в основном белков). Используемые обычно способы выделения ДНК являются довольно жесткими, и возникающие в процессе выделения градиенты скорости, а также некоторые биохимические факторы приводят к разрыву молекул ДНК на куски, содержащие не более нескольких десятков тысяч или, самое большее, сотен тысяч звеньев. Истинная длина молекул в живой клетке или в вирусной частице сильно различна для разных типов живых организмов. Так, для различных вирусов длина молекулы ДНК может меняться от нескольких тысяч звеньев до сотен тысяч звеньев. Молекула ДНК бактерий содержит уже несколько миллионов звеньев. При этом было установлено, что весь набор генетической инфор-мации бактерии заключен в последовательности одной гигантской молекулы ДНК, контурная длина которой равна приблизительно одному миллиметру. В более сложных, многоклеточных организмах генетическая информация записана не непрерывно, а содержится в нескольких отдельных молекулах ДНК. Суммарная контурная длина всех молекул ДНК, несущих полный одиночный объем информации (этот полный набор генетической информации называется геномом), равна для человека, например, приблизительно 1,8 м, т. е. содержит несколько миллиардов звеньев.

Кроме увеличения объема генетической информации, отличие многоклеточных организмов от бактерий и вирусов состоит в том, что в многоклеточных ДНК находится в очень тесном комплексе с белком. Наличие этого комплекса особенно явственно проявляется на стадии клеточного деления, во время которого ДНК и белок образуют особые частицы, хорошо видные в оптический микроскоп, -- хромосомы. О структуре этих нуклеопротеидных комплексов пока известно очень мало.

3. Реализация генетической информации, записанной в виде последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, происходит следующим образом (ниже дано весьма схематическое и несколько утрированное описание процессов; более подробно, см., например, прекрасную книгу Дж. Уотсона ⁶⁸). На одной из нитей молекулы ДНК (эта нить называется значащей) с помощью специального фермента РНК-полимеразы про-исходит синтез комплементарной этой нити молекулы РНК, называемой информационной РНК (mPHK - от английского слова messenger). Этот процесс называется процессом т р а н с к р и п ц и и. Копия снимается, однако, не со всей молекулы ДНК, а лишь с малой ее части, называемой г е н о м. Ген заключает в себе информацию о химической структуре одной белковой молекулы. Синтезированная на гене mPHK образует комплекс со специальными частицами, называемыми рибосомами, которые осуществляют синтез белка по плану, принесенному mPHK. Дело в том, что молекулы белка, с помощью которых осуществляются практически все функции живого организма (белками являются все ферменты; кроме того, все структурные компоненты клетки и живого организма в целом состоят в значительной степени из белков), представляют собой линейную полимерную цепь, весьма причудливо уложен-ную в пространстве. Мономерным звеном белковой цепи служат остатки аминокислот, так что белковая цепь (ее часть называют также полипентидной) имеет вид

Аминокислотные остатки отличаются друг от друга радикалом R. Bcero в белках встречается 20 сортов аминокислотных остатков. Простейшим из них является глицин, где вместо R стоит просто водород. Далее следует аланин, имеющий в качестве R метильную группу СН₃, и т. д.

Рибосомы осуществляют перевод (трансляцию) с языка полинуклеотид-ного на язык полиаминокислотный. Словарь, которым пользуется рибосома при переводе, называется генетическим кодом. Генетический код в настоя-щее время расшифрован (см. например, книгу Уотсона⁶⁸). Существенную роль в этом

процессе играют особые очень маленькие молекулы РНК, называемые транспортной РНК (tPHK), которые содержат всего около сотни нуклеотидов и осуществляют перенос аминокислотных остатков из раствора в полицептидную цепь.

4. Макромолекулярную структуру однонитевой и двунитевой ДНК, или, как часто говорят, морфологию молекулы ДНК в растворе, устанавливают при помощи обычных методов физики растворов полимеров (см. монографию ⁶⁹). Так, статистический сегмент однонитевой ДНК был определен из данных по вязкости в работе ⁴ для ДНК фага T2, а в работе ⁷⁰ — для гомополимера поли-У, причем получены практически совпадающие результаты. Относительно величины статистического сегмента двуспиральной ДНК полная определенность пока отсутствует, так как светорассеяние и гидродинамические методы дают различные результаты (см. ⁷¹). Величину статистического сегмента приблизительно в 300 пар оснований дают гидродинамические данные. Методы физики растворов полимеров не дают возможности сделать выбор между двумя моделями гибкости полимерной цепи — зигзагообразной, в которой молекула представляет собой цепь из свободно-сочлененных совершенно жестких стержней, и червеобразной (персистентной), в которой молекула ведет себя подобно резиновому шлангу, обладая некоторой очень малой гибкостью в каждой точке. Этот вопрос был разрешен в пользу червеобразной модели, когда было показано ⁶², что в ДНК отсутствуют на расстоянии по крайней мере в несколько тысяч пар оснований локально денатурированные участки, которые могли бы служить шарнирами в случае зигзагообравной модели.

5. Хорото изученным, как экспериментально, так и теоретически, примером однонитевого гомополимера, испытывающего переход спираль — клубок при изменении условий среды, является полипептид (см. примечание 3). Молекула полипептида может образовывать так называемую аспираль, в которой цепь закручена в винтовую линию, скрепленную водородными связями, образованными вдоль оси винтовой линии между группами N — H и C — O аминокислотных остатков, отстоящих друг от друга на три звена вдоль цепи. При изменении внешних условий (температуры, pH, состава растворителя) а-спираль может разрушаться, переходя в обычную гибкую полимерную цепь. Впервые модель Изинга к описанию перехода спираль—клубок в полипептиде примении Зимм и Брэгг в 1958 г. Предпринятые в дальнейшем экспериментальные и теоретические работы показали, что результаты расчетов, выполненных в рамках модели Изинга, находятся в количественном согласии с опытом. Подробно эти вопросы изложены в монографии ⁷².

6. Как уже отмечалось, каждое состояние свободно-сочлененной «бестелесной» (т. е. без взаимодействия удаленных вдоль цепи частей) цепи эквивалентно траектории броуновской частицы. При этом роль времени играет число сегментов цепи v. Поэтому вероятность P (h) того, что концы цепочки из v сегментов находятся на расстоянии от h до h + dh друг от друга, равна (см., например, ⁷³)

$$P(\mathbf{h}) d\mathbf{h} = \left(\frac{3}{2\pi \nu l^2}\right)^{3/2} e^{-\frac{3\hbar^2}{2\nu l^2}} d\mathbf{h}.$$

Вероятность того, что оба конца попадут в малый объем δV , будет равна, очевидно, P (0) δV , что приводит к формуле (9) основного текста.

7. Приведенные в основном тексте результаты получены при существенном использовании предположения (на котором основано все рассмотрение перехода спираль—клубок в ДНК), что при плавлении не происходит полного расхождения нитей. Именно поэтому мы могли пользоваться уравнением реакции первого порядка (82) для описания равновесия спираль—клубок. Имеется ряд экспериментальных ситуаций, в которых такое рассмотрение является оправданным даже для коротких участков, т. е. нити на самом деле не расходятся. Например, в работе ⁵³ формулы (81), (83) использовались для оценки длины легкоплавких участков в составе ДНК фага T2, выплавляющихся при температуре ниже начала плавления основной части молекулы, в предположении, что они представляют собой последовательности, состоящие почти исключительно из АТ-пар. Ясно, что в этом случае следует рассматривать именно реакцию первого порядка.

Существуют, однако, иные ситуации, встречающиеся при исследовании гомогенных двунитевых олигонуклеотидов (т. е. очень коротких полинуклеотидов), в которых за время проведения опыта успевает устанавливаться равновесие между двунитевыми и однонитевыми олигонуклеотидами. В этом случае необходимо рассматривать реакцию второго порядка. Это было сделано Эпплквистом и Дэмлом⁷⁴. Следуя их работе, рассмотрим равновесие между одиночными и двуспиральными цепями комплементарных олигонуклеотидов А и В, считая, как и прежде, что процесс происходит по принципу «все или ничего»:

$$A + B \rightleftharpoons AB$$
.

Уравнение равновесия имеет вид

$$\frac{[AB]}{[A] [B]} = K.$$

Ввелем полную концентрацию С однонитевых олигонуклеотидов одного сорта: [A] + [AB] = C.

Считая, что [A] = [B], получим квадратное уравнение

$$K[A]^2 + [A] - C = 0,$$

откуда для доли расплавленных звеньев 1 — $\vartheta = [A]/C$ получаем

$$1 - \vartheta = \frac{1}{2KC} [(1 + 4KC)^{1/2} - 1].$$

Эта формула описывает равновесие спираль — клубок в коротких олигонуклеотидах. Из нее следует, что степень превращения из спирального состояния в клубкообразное зависит как от температуры (через константу равновесия К), так и от концентрации олигонуклеотида С. Точка плавления, при которой половина звеньев находится в клубкообразном состоянии, определяется, очевидно, из условия

$$K_m C = 2.$$

Константа равновесия K будет, очевидно, равна (ср. с (82))

$$K = \frac{2}{C_0} e^{-\frac{\mathbf{v}\Delta F + F_s}{T}},$$

где C₀-не зависящая от v и T постоянная, имеющая размерность концентрации. Из условия $K_m C = 2$ находим для T_m уравнение

$$\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_0} = \frac{1}{v} \left[\frac{F_s}{U} \frac{1}{T_m} - \frac{1}{U} \ln \frac{C}{C_0} \right],$$

где T_0 — температура плавления длинного гомополинуклеотида (при $v \rightarrow \infty$). Эта формула существенно отличается от формулы (81) тем, что в нее входит концентрация С олигонуклеотида в растворе.

Дифференцируя выражение для 1 — в по T, получаем для ширины интервала плавления формулу

$$\Delta T = \frac{6}{v} \frac{T_m^2}{U}.$$

Эта формула совершенно аналогична формуле (83) и отличается от нее только числовым множителем.

В последнее время появился ряд экспериментальных исследований плавления очень коротких двунитевых гомополинуклеотидов, в которых была показана применимость к таким системам изложенной выше теории Эпплквиста и Дэмла.

Институт атомной энергии им. И. В. Курчатова

ШИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1. «Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот», под редакцией

- Мол. биол. 3, 133 (1969).
- 5. А. В. Шугалий, М. Д Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, Мол. биол. 5, 637 (1971). 6. I. E. Scheffler, J. M. Sturtevant, J. Mol. Biol. 42, 577 (1969).
- 7. П. Л. Привалов, Мол. биол. 3, 690 (1969).
- 8. J. Маг тиг, Р Doty, J. Mol. Biol. 5, 109 (1962). 9. R. J. Owen, L. R. Hill, S. P. Lараде, Biopolymers 7, 503 (1969). 10. Ю. Н. Косаганов, Ю. С. Лазуркин, Н. В. Сидоренко, Мол. биол.
- 1, 352 (1967).

- 1, 352 (1967). 11. J. C. Wang, J. Mol. Biol. 43, 25 (1969). 12. J. Vionograd, J. Leibowitz, R. Watson, J. Mol. Biol. 33, 173 (1968). 13. И. В. Берестецкая, Ю. Н. Косаганов, Ю. С. Лазуркин, Э. Н. Трифонов, М. Д. Франк-Каменецкий, Мол. биол. 4. 137 (1970).

- 14. Mathematical Physics in One-dimension (E. H. Lieb and D. C. Mattis, Eds.), Academic Press, New York, 1966. 15. H. Jacobson, W. H. Stockmayer, J. Chem. Phys. 18, 1600 (1950). 16. B. H. Zimm, J. Chem. Phys. 33, 1349 (1960).

- 10. D. H. 2 i m m, J. Chem. Phys. 50, 1040 (1960).
 17. S. Lifson, B. H. Z i m m, Biopolymers 1, 15 (1963).
 18. D. M. Crothers, B. H. Z i m m, J. Mol. Biol. 9, 1 (1964).
 19. D. Poland, H. A. Scheraga, J. Chem. Phys. 45, 1464 (1966).
 20. J. Applequist, J. Chem. Phys. 45, 3459 (1966).
 21. M. E. Fisher, J. Chem. Phys. 45, 1469 (1966).
 22. M. E. Fisher, J. Chem. Phys. 45, 1469 (1966).

- 22. М. Д. Франк Каменецкий, Мол. биол. 2, 408 (1968). 23. L. C. Klotz, Biopolymers, 7, 265 (1969).

- 24. Э. Шрёдингер, Статистическая термодинамика, М., ИЛ, 1948. 25. Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц, Статистическая физика, М., «Наука», 1964. 26. J. Аррlequist, J. Chem. Phys. 50, 600 (1969). 27. Э. Н. Трифонов, М. Д. Франк Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, в сборнике «Структура и генетические функции биополимеров», Ин-т атомной энергии им. И. В. Курчатова, М., 1969, стр. 305. 28. J. A p l e q u is t, J. Chem. Phys. 50, 609 (1969). 29. B. Goldstein, C. De Lisi, J. Chem. Phys. 51, 431 (1969).

- 30. M. Go, J. Chem. Phys. 23, 597 (1967).
- 31. J. H i j m a n s, J. Chem. Phys. 47, 5116 (1967).
- 32. Р.- G. De Gennes, Biopolymers 6, 715 (1968). 33. Г. М. Мревлишвили, П. Л. Привалов, Ж. структурной химии 9, 9 (1968).
- 34. М. Д. Франк-Каменецкий, ДАН СССР 157, 187 (1964); Высокомол. соедин. 7, 354 (1965).
- 35. М. Д. Франк Каменецкий, в сборнике «Структура, свойства и генетические функции ДНК», Ин-т атомной энергии им. И. В. Курчатова, М., 1966, стр. 33.
- 36. А. И. Полетаев, В. И. Иванов, Л. Е. Минченкова, А. К. Щелкина, Мол. биол. 3, 303 (1969).
- 37. H. Reiss, D. A. McQuarrie, J. P. McTague, E. R. Cohen, J. Chem Phys. 44, 4567 (1966).
- 38. M. Ozaki, M. Tanaka, Y. Kawai, E. Teramoto, Progr. Theor. Phys. Japan 38, 10 (1967).
- А. А. Веденов, А. М. Дыхне, А. Д. Франк-Каменецкий, М. Д. 39 Франк - Каменецкий, Мол. биол. 1, 313 (1967).
- 40. G. W. Lehman, в сборнике «Statistical Mechanics. Foundations and Applications» (T. A. Bak, Ed.), W. A. Benjamin, New York, 1967, p. 204. 41. G. W. Lehman, J. P. McTague, J. Chem. Phys. 49, 3170 (1968).
- 42. Т. М. Бирштейн, Н. З. Наморадзе, Сообщ. Акад. наук ГрузССР 49. 299 (1968).
- 43. T. R. Fink, D. M. Crothers, Biopolymers 6, 863 (1968). 44. S. S. Cohen, O. Penrose, J. Chem. Phys. 52, 5018 (1970).
- 45. М. Д. Франк-Каменецкий, А. Д. Франк-Каменецкий, Мол. биол. 3, 375 (1969).
- 46. А. А. Веденов, А. М. Дыхне, ЖЭТФ 55, 357 (1968).
- 47. М. Д. Франк Каменецкий, в сборнике «Структура и генетические функции биополимеров», Ин-т атомной энергии им. И. В. Курчатова, М., 1969, стр. 296. 48. D. M. Crothers, Biopolymers 6, 1391 (1968).
 49. B. E. Eichinger, M. Fixman, Biopolymers 9, 205 (1970).
 50. M. Fixman, D. Zeroka, J. Chem. Phys. 48, 5223 (1968).

- 51. А. В. Шугалий, М. Д. Франк Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, Мол. биол. 4, 275 (1970).
- 52. А. В. Шугалий, М. Д. Франк Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, Мол. биол. 5 (3), 766 (1971).
- 53. Ю. Л. Любченко, Э. Н. Трифонов, Ю. С. Лазуркин, М. Д. Франк-Каменецкий, Мол. биол. 5 (2), 772 (1971). 54. D. M. Crothers, N. R. Kallenbach, B. H. Zimm, J. Mol. Biol. 11,
- 802 (1965).
- 55. М. Д. Франк-Каменецкий, А. Д. Франк-Каменецкий, Мол. биол. 2, 778 (1968).
 56. Р. G. De Gennes, Rept. Progr. Phys. 32, 187 (1969).
- 57. S. F. E d w a r d s, Proc. Phys. Soc. 91, 513 (1967).

- 58. S. F. E dwards, J. Phys. AI, 15 (1968).
 59. P. F. Devison, Biopolymers 5, 715 (1967).
 60. H. Ch. Spatz, D. M. Crothers, J. Mol. Biol. 42, 191 (1969).
- 61. H. R. Massie, B. H. Zimm, Biopolymers 71, 475 (1969).
- 62. Э. Н. Трифонов, Н. Н. Шафрановская, М. Д. Франк-Каме-нецкий, Ю. С. Лазуркин, Мол. биол. 2, 887 (1968).

- 63. Ю. С. Лазуркин, М. Д. Франк-Каменецкий, Э. Н. Трифонов, Biopolymers 9, 1253 (1970).
 64. Ю. Н. Косаганов, М. И. Зарудная, Ю. С. Лазуркин, М. Д. Франк-Каменецкий, Р. Ш. Бибилашвили, Л. П. Савочкина, Nature New Biol. 231, 212 (1971).
 65. В. М. Аlberts, L. Frey, Nature 227, 1313 (1970).
 66. Дж. Уотсон, Двойная спираль, М., «Мир», 1969.
 67. М. J. В. Типіs-Schneider, М. F. Маеstre, J. Mol. Biol. 52, 521 (1970).
 68. Дж. Уотсон, Молекулярная биология гена, М., «Мир», 1967.
 69. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворе, М., «Наука», 1964.

- кул в растворе, М., «Наука», 1964. 70. D. Inners, G. Felsenfeld, J. Mol. Biol. 50, 373 (1970). 71. J. B. Hays, M. E. Magar, B. H. Zimm, Biopolymers 8, 531 (1969). 72. Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын, Конформации макромолекул, М., «Нау-
- ка», 1964. 73. М. В. Волькенштейн, Конфигурационная статистика полимерных цепей, М., Изд-во АН СССР, 1959.
- 74 J. Applequist, V. Damle, J. Amer. Chem. Soc. 87, 1450 (1965).