

УДК 573.3

Ю. М. Евдокимов¹, В. И. Салянов¹, О. Н. Компанец², Е. И. Кац³, С. Г. Скуридин¹

**ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЧАСТИЦ
ХОЛЕСТЕРИЧЕСКОЙ И «ВОЗВРАТНОЙ» ХОЛЕСТЕРИЧЕСКОЙ ФАЗ ДНК**

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,
ул. Вавилова, д. 32, 119311 Москва, Россия

²Институт спектроскопии Российской академии наук,
ул. Физическая, д. 5, 108840 Москва, Троицк, Россия

³Институт теоретической физики им. Л. Д. Ландау РАН,
пр-т Академика Семенова, д. 1, 1142432, Черноголовка, Россия
E-mail: yevdokim@eimb.ru

Фазовое исключение молекул ДНК из водно-солевых растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ) при комнатной температуре приводит к формированию жидкокристаллических дисперсий (ЖКД) с холестерической и гексагональной упаковками молекул ДНК, определяемых осмотическим давлением раствора ПЭГ. ЖКД с холестерической упаковкой ДНК (ХЖКД) обладают интенсивной отрицательной полосой в спектре кругового дихроизма (КД) в области поглощения азотистых оснований. У частиц ЖКД с гексагональной упаковкой аномальная полоса отсутствует. При увеличении температуры раствора, содержащего частицы ХЖКД ДНК, наблюдается уменьшение аномальной полосы в спектре КД. Охлаждение дисперсии приводит не только к восстановлению исходной аномальной полосы, но и к увеличению ее амплитуды. При нагревании ЖКД с гексагональной упаковкой ДНК такая полоса появляется, т. е. происходит фазовый переход: гексагональная упаковка → «возвратная» холестерическая упаковка. Охлаждение «возвратной» холестерической фазы ($C_{ПЭГ} = 240 \text{ мг мл}^{-1}$) сопровождается дальнейшим ростом аномальной оптической активности, тогда как охлаждение дисперсии, образованной при $C_{ПЭГ} = 300 \text{ мг мл}^{-1}$, вызывает не увеличение, а уменьшение амплитуды аномальной полосы. Следовательно, равновесные значения амплитуды аномальных полос в спектрах КД частиц этих дисперсий реализуются в результате разнонаправленных процессов. Кинетические кривые изменения пространственной структуры частиц ЖКД с «возвратной» холестерической упаковкой молекул ДНК при их охлаждении до комнатной температуры носят волнообразный характер. Сопоставление этих кривых показывает, что рост осмотического давления раствора ПЭГ сопровождается усилением их «волнообразного» характера. Таким образом, формирование «возвратных» холестерических фаз ДНК определяется не только осмотическим давлением раствора ПЭГ и его температурой, но и средним расстоянием между молекулами ДНК в частицах дисперсий с исходной гексагональной упаковкой.

Ключевые слова: частицы жидкокристаллических дисперсий дц ДНК, круговой дихроизм, аномальная оптическая активность, холестерическая упаковка дц молекул ДНК, гексагональная упаковка дц молекул ДНК, температурная кинетика формирования «возвратной» холестерической фазы дц ДНК, переход гексагональная → «возвратная» фаза дц ДНК.

DOI: 10.18083/LCAppl.2019.3.59

Yu. M. Yevdokimov¹, V. I. Salyanov¹, O. N. Kompanets², E. I. Kats³, S. G. Skuridin¹

**OPTICAL PROPERTIES OF THE DNA PARTICLES
OF CHOLESTERIC AND «RE-ENTRANT» CHOLESTERIC PHASES**

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences,
32 Vavilova St., Moscow, 119991 Russia

²Institute of Spectroscopy of the Russian Academy of Sciences.
5 Fizicheskaya St., Moscow, Troitsk, 108840, Russia.

³Landau Institute for Theoretical Physics of the Russian Academy of Sciences,
1 Academician Semenov Ave., Chernogolovka, 1142432, Russia.
E-mail: yevdokim@eimb.ru

Phase exclusion of DNA molecules from polyethylene glycol (PEG) water-salt solutions leads to formation at room temperature of liquid-crystalline dispersions (LCD) with cholesteric and hexagonal packing of DNA molecules, determined by the osmotic pressure of the PEG solution. LCDs with cholesteric DNA packing (CLCD) have an intense negative band in the circular dichroism (CD) spectrum in the absorption region of nitrogen bases. LCD particles with hexagonal packing have no abnormal band. With increase of the solution temperature containing DNA CLCD particles, a decrease in the abnormal band in the CD spectrum is observed. Cooling of the dispersion leads not only to the restoration of the initial abnormal band, but also increases its amplitude. When the heating LCD with hexagonal DNA packing occurs, such band appears, i.e. there is the “hexagonal packing → “re-entrant” cholesteric packing phase transition. Cooling of the “re-entrant” cholesteric phase ($C_{PEG} = 240 \text{ mg ml}^{-1}$) is accompanied by further increase in abnormal optical activity, whereas cooling of the dispersion formed at $C_{PEG} = 300 \text{ mg ml}^{-1}$ causes decrease of the abnormal band amplitude. Consequently, equilibrium amplitude values of abnormal bands in CD spectra of these dispersion particles are realized as a result of multidirectional processes. When cooled to room temperature, the kinetic curves designating changes in the spatial structure of LCD particles with the “re-entrant” cholesteric packing of DNA molecules have a wave-like character. Comparison of these curves shows that the osmotic pressure increase of the PEG solution is accompanied by the increase of the wave-like character. Thus, the formation of the “re-entrant” cholesteric phases of DNA is determined not only by the osmotic pressure and temperature of PEG solution, but also by the average distance between DNA molecules in dispersion particles with the original hexagonal packing.

Key words: liquid-crystalline ds DNA dispersion particles, circular dichroism, abnormal optical activity, cholesteric packing of ds DNA molecules, hexagonal packing of ds DNA molecules, temperature kinetics of formation of ds DNA cholesteric “re-entrant” phase, hexagonal → “re-entrant” phase of ds DNA transition.

Введение

Известно, что при комнатной температуре в водно-солевых растворах могут быть сформированы как жидкокристаллические (ЖК) фазы, так и жидкокристаллические дисперсии (ЖКД) двухцепочечных (дц) молекул ДНК [1]. Переход от ЖК-фаз к частицам ЖКД, формируемым в результате фазового исключения молекул ДНК из водно-солевых растворов полимеров, приводит к постановке вопроса о том, каким образом упакованы молекулы дц ДНК в частицах дисперсий [2–4]. Ответ на этот вопрос важен потому, что физико-химические свойства частиц дисперсий в силу так называемых «эффектов конечного размера» [5–7] могут значительно отличаться от свойств, характерных для массивных ЖК-фаз. Кроме того, свойства частиц ЖКД ДНК интересны тем, что такие частицы позволяют более корректно моделировать свойства ДНК-содержащих вирусов или хромосом простейших, которые представляют собой по существу дисперсные системы микроскопического размера с упорядоченной, но подвижной упаковкой ДНК [8, 9].

Первый шаг в этом направлении был сделан в работе [10], в которой сопоставлены способы упаковки дц молекул ДНК в частицах ЖКД, сформированных в водно-солевых растворах полиэтиленгликоля (ПЭГ) с разным осмотическим давлением. Кроме того, в работе [11] была обнаружена новая «возвратная» холестерическая фаза ДНК.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы получить дополнительные экспериментальные данные о свойствах частиц ЖКД холестерических фаз ДНК, которые формируются в растворах ПЭГ с разным осмотическим давлением при повышении температуры этих растворов. Кроме того, впервые были получены кинетические кривые, характеризующие скорость изменения пространственной структуры частиц с «возвратной» холестерической упаковкой молекул ДНК при охлаждении этих частиц. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование «возвратных» холестерических фаз ДНК определяется не только осмотическим давлением раствора ПЭГ и его температурой, но также и характерным средним расстоянием между молекулами ДНК в частицах с гексагональной упаковкой. Высказано предположение, согласно которому структура «возвратной» холестерической фазы не описывается простой ортогональной холестерической спиралью с постоянным шагом.

Эксперимент

Использовали дополнительно очищенный от примесей и деполимеризованный препарат дц ДНК из тимуса телят («*Sigma*», США) с молекулярной массой $\sim (0,3\text{--}0,8) \times 10^6$ Да. Молекулярную массу ДНК после очистки и деполимеризации определяли при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле.

Концентрацию ДНК в водно-солевых растворах определяли спектрофотометрически, пользуясь известным значением молярного коэффициента поглощения ($\varepsilon_{258.4} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Препарат ПЭГ («*Sigma*» (*BioUltra*), США; молекулярная масса 4000 Да) использовали без дополнительной очистки.

Исходный водно-солевой раствор ПЭГ (0,3 М NaCl, $C_{\text{ПЭГ}} = 600 \text{ мг мл}^{-1}$) готовили, растворяя навески NaCl и ПЭГ в 0,002 М Na^+ -фосфатном буфере ($\text{pH} \sim 7.0$).

Дисперсии дц ДНК в водно-солевых растворах с разным содержанием ПЭГ (в интервале концентраций от 120 до 300 мг мл^{-1}) формировали в соответствии с методикой, описанной ранее [3]. Согласно этой методике, равные объемы водно-солевых растворов, один из которых содержал ДНК, а другой – ПЭГ (концентрация ДНК и ПЭГ в растворах в два раза превышала требуемые конечные значения), смешивали; полученную смесь интенсивно встряхивали на вихревом встряхивателе «*IKA VORTEX Genius 3*» (Германия) в течение 1 мин. После этого полученную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч для завершения формирования дисперсии ДНК, а затем использовали в работе.

Концентрация ДНК в исследованных ПЭГ-содержащих растворах составляла 10 мкг мл^{-1} .

Спектры поглощения растворов регистрировали при помощи спектрофотометра *Cary 100 Scan* («*Varian*», США), а спектры кругового дихроизма (КД) – при помощи портативного дихрометра СКД-2 (разработка Института спектроскопии РАН, г. Москва, г. Троицк). Спектры КД представляли в виде зависимости разности интенсивности поглощения лево- и правополяризованного света (ΔA ; $\Delta A = (A_L - A_R)$) от длины волны (λ) [12].

Во всех случаях использовали прямоугольные кварцевые кюветы («*Helma*» 100 QS, Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Температуру в терморегулируемом отсеке дихрометра в интервале от 20 до 80 °С устанавливали при помощи программы «Управление температурой», входящей в состав программного обеспечения прибора. После установки необходимого значения температуры кювету, содержащую 2 мл дисперсии ДНК, выдерживали в течение 10 мин при заданной температуре и затем приступали к регистрации спектра КД в интервале длин волн 250–350 нм.

Кинетику изменения амплитуды аномальной полосы в спектре КД ЖКД ДНК ($\lambda = 270$ нм) при

ее охлаждении от 80 °С до 22 °С регистрировали при помощи программы «Кинетика», также входящей состав в программного обеспечения портативного дихрометра.

Результаты

Формирование частиц дисперсии холестерической фазы при фазовом исключении молекул ДНК

Спектр КД, характерный для линейной В-формы ДНК, приведен на рис. 1, а (кривая 1).

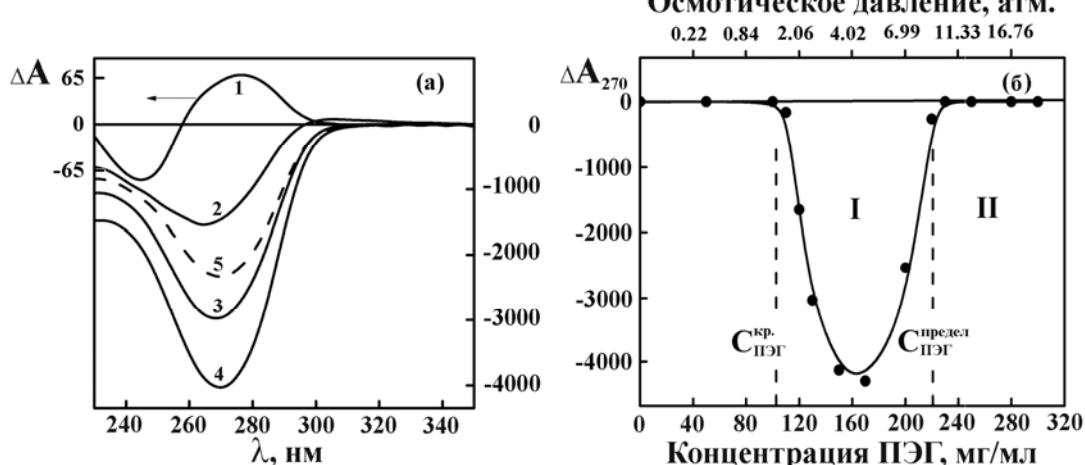


Рис. 1. Спектры КД ДНК: а – спектры КД водно-солевого раствора линейной В-формы ДНК (кривая 1, левая ось ординат) и ЖКД ДНК, сформированных в водно-солевых растворах с разной концентрацией ПЭГ (кривые 2–5, правая ось ординат):
 $C_{\text{ПЭГ}} = 0$ (1), 120 (2), 130 (3), 170 (4), 200 мг мл^{-1} (5).

$C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкг} \text{ мл}^{-1}$, 0,3 М $\text{NaCl} + 0,002 \text{ М} \text{Na}^+$ -фосфатный буфер, $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1 \text{ см}$, $T = 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$; б – зависимость амплитуды полосы в спектрах КД водно-солевых растворов ДНК ($\lambda = 270$ нм) от концентрации ПЭГ.

На верхней оси абсцисс приведены значения осмотического давления растворов ПЭГ, концентрации которых указаны на нижней оси.

$C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкг} \text{ мл}^{-1}$, 0,3 М $\text{NaCl} + 0,002 \text{ М} \text{Na}^+$ -фосфатный буфер, $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1 \text{ см}$, $T = 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$. $C_{\text{кр.ПЭГ}}$ и $C_{\text{предел.ПЭГ}}$ – соответственно «критическая» и «пределная» концентрации ПЭГ, определяющие «граничные» условия существования ЖКД с холестерической упаковкой молекул ДНК (область I); в области II образуются частицы дисперсий с гексагональной упаковкой молекул ДНК

Fig. 1. CD spectra of DNA: a – CD spectra of the water-salt solution of the linear B-form DNA (curve 1, left ordinate) and DNA LCDs formed in water-salt solutions with different concentrations of PEG (curves 2–5, right ordinate):

$C_{\text{PEG}} = 0$ (1), 120 (2), 130 (3), 170 (4), 200 mg ml^{-1} (5).

$C_{\text{DNA}} = 10 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$, 0,3 М $\text{NaCl} + 0,002 \text{ M} \text{Na}^+$ phosphate buffer, $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ optical units, $L = 1 \text{ cm}$, $T = 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$; b – dependence of the band amplitude in the CD spectra of water-salt DNA solutions ($\lambda = 270$ nm) on PEG concentration. Osmotic pressure values of the PEG solutions are given on the upper abscissa axis. Concentrations of PEG are indicated on the lower axis.

$C_{\text{DNA}} = 10 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$, 0,3 М $\text{NaCl} + 0,002 \text{ M} \text{Na}^+$ phosphate buffer, $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ optical units, $L = 1 \text{ cm}$, $T = 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$. $C_{\text{cr.PEG}}$ and $C_{\text{limit.PEG}}$ are the “critical” and “limit” PEG concentrations, respectively. They determine the “boundary” conditions for the existence of LCDs with cholesteric packing of DNA molecules (domain I). Dispersion particles with hexagonal packing of DNA molecules are formed in domain II

В интервале осмотического давления (π) раствора ПЭГ до ~ 20 атм. (рис. 1, б) молекулы ДНК сохраняют свою принадлежность к В-форме, что подтверждается данными рентгеноструктурного анализа и спектроскопии кругового дихроизма [13–15].

Формирование ЖКД при комнатной температуре в результате фазового исключения дц молекул ДНК из водно-солевых растворах ПЭГ при концентрации ПЭГ, превышающей «критическое» ($C_{\text{кр.ПЭГ}}$) значение, сопровождается появлением интенсивной (аномальной) отрицательной полосы в спектре КД, расположенной в области поглощения азотистых оснований (рис. 1, а, кривые 2–5). Появление аномальной полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований ДНК (рис. 1, а, кривая 2) свидетельствует, согласно теории [12, 16], об их спиральной пространственной упаковке. Поскольку пары азотистых оснований жестко фиксированы по отношению к длинной оси молекул ДНК, такая упаковка возможна лишь в том случае, когда соседние молекулы ДНК упакованы в частицах ЖКД с образованием спирально закрученной (холестерической) структуры. Этот вывод подтвержден не только наличием текстуры «отпечатков пальцев» у холестерических фаз дц ДНК [3], но и тем фактом, что некоторые участки тонких слоев холестерической ЖК-фазы ДНК характеризуются аномальной полосой в спектре КД [14, 17].

Формирование ЖКД ДНК в растворах ПЭГ с осмотическим давлением более 10 атм. (рис. 1, б, область II) сопровождается уменьшением амплитуды аномальной полосы в спектрах КД вплоть до ее полного исчезновения. Уменьшение амплитуды аномальной полосы в спектре КД при увеличении концентрации ПЭГ в растворе (рис. 1, б, область II) свидетельствует о раскрутке спиральной структуры частиц дисперсии ДНК.

Таким образом, фазовое исключение дц молекул ДНК при комнатной температуре приводит к формированию частиц ЖКД, различающихся в зависимости от осмотического давления раствора ПЭГ, разными способами упаковки этих молекул.

На рисунке 2 в качестве примера показано изменение спектра КД холестерической дисперсии дц ДНК, сформированной при комнатной температуре в области I ($C_{\text{ПЭГ}} = 170 \text{ мг мл}^{-1}$, $\pi = 4,62 \text{ атм.}$, кривая 1) и нагретой до 80°C (кривая 2). Кривая 3 – это спектр КД при последующем охлаждении дисперсии до 22°C .

Уменьшение амплитуды аномальной полосы в спектре КД дисперсии при увеличении температуры

раствора (ср. кривые 1 и 2 на рис. 2) носит название «КД-плавления» [3] и отражает раскручивание спиральной структуры частиц дисперсии ДНК.

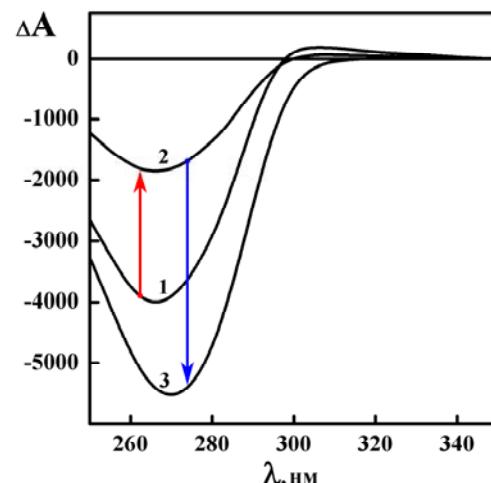


Рис. 2. Спектры КД исходной дисперсии ДНК, сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ при 22°C (1), нагретой до 80°C (2), а затем охлажденной до комнатной температуры ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$ (3)).

$C_{\text{ПЭГ}} = 170 \text{ мг мл}^{-1}$, $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкг мл}^{-1}$,
 $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+$ -фосфатный буфер,
 $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1 \text{ см.}$

Красная стрелка показывает изменение оптической активности исходной дисперсии ДНК при нагревании ($22 \rightarrow 80^\circ\text{C}$), а синяя – при охлаждении ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$)

Fig. 2. CD spectra of the initial dispersion of DNA formed in water-salt solution of PEG at 22°C (1), heated to 80°C (2), and then cooled to room temperature ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$ (3)).

$C_{\text{PEG}} = 170 \text{ mg ml}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$,
 $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+$ -phosphate buffer,
 $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ optical unit, $L = 1 \text{ cm.}$

The red arrow shows the change in the optical activity of the original DNA dispersion when heated ($22 \rightarrow 80^\circ\text{C}$), and the blue arrow – when cooled ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$)

Охлаждение дисперсии приводит не только к восстановлению аномальной полосы в спектре КД, но и увеличению ее амплитуды (кривая 3). Этот эффект вполне соответствует представлению о «термической тренировке» ЖКД дц ДНК [18, 19], приводящей к улучшению упаковки молекул ДНК в «квазинематических» слоях частиц дисперсии. Отмеченное изменение спектра КД при нагревании и охлаждении характерно практически для всех дисперсий, сформированных в области I осмотического давления раствора ПЭГ.

Формирование частиц дисперсии «возвратной» холестерической фазы ДНК

На рисунке 3 показано изменение спектра КД дисперсии дц ДНК, сформированной при $C_{\text{ПЭГ}} = 240 \text{ мг мл}^{-1}$ (кривая 1, $\pi = 11,33 \text{ атм.}$, область **II**, рис. 1, б), при ее нагревании до 80°C и последующем охлаждении до комнатной температуры. Важно заметить, что при всех концентрациях ПЭГ, соответствующих области **II**, для частиц дисперсий, сформированных в результате фазового исключения дц ДНК, характерна гексагональная упаковка молекул [20–23].

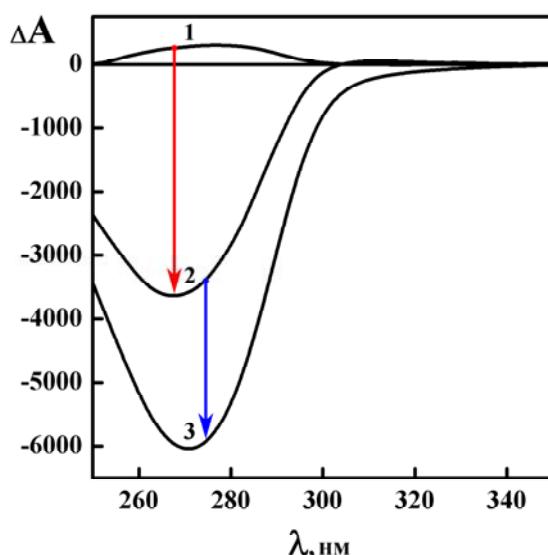


Рис. 3. Спектры КД исходной дисперсии ДНК, сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ при 22°C (1), нагретой до 80°C (2), а затем охлажденной до комнатной температуры ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$ (3)).

$C_{\text{ПЭГ}} = 240 \text{ мг мл}^{-1}$, $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкг мл}^{-1}$,
 $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+$ -фосфатный буфер,
 $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1 \text{ см.}$

Красная стрелка показывает изменение оптической активности исходной дисперсии ДНК при нагревании ($22 \rightarrow 80^\circ\text{C}$), а синяя – при охлаждении ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$)

Fig. 3. CD spectra of the initial dispersion of DNA formed in water-salt solution of PEG at 22°C (1), heated to 80°C (2), and then cooled to room temperature ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$ (3)).

$C_{\text{PEG}} = 240 \text{ mg ml}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} = 10 \text{ \mu g ml}^{-1}$,
 $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+$ -phosphate buffer,
 $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ optical unit, $L = 1 \text{ cm.}$

The red arrow shows the change in the optical activity of the original DNA dispersion when heated ($22 \rightarrow 80^\circ\text{C}$), and the blue arrow – when cooled ($80 \rightarrow 22^\circ\text{C}$)

Рисунок 3 показывает, что в этом случае наблюдается необычный эффект: у частиц дисперсии ДНК, практически не имевшей при комнатной температуре аномальной полосы в спектре КД (рис. 3, кривая 1), такая полоса появляется (кривая 2). Появление аномальной полосы в спектре КД ЖКД ДНК отражает, согласно теории [12, 16], холестерическую упаковку соседних дц молекул ДНК в частицах ЖКД. Это означает, что при нагревании ЖКД, сформированной в указанных условиях, гексагональная упаковка молекул ДНК меняется и происходит фазовый переход «гексагональная упаковка» \rightarrow «возвратная» холестерическая упаковка» молекул ДНК в частицах дисперсий [11].

Охлаждение (после нагревания) «возвратной» холестерической фазы, сформированной из частиц с исходной гексагональной упаковкой при осмотическом давлении $11,33 \text{ атм.}$ ($C_{\text{ПЭГ}} = 240 \text{ мг мл}^{-1}$), сопровождается дальнейшим ростом аномальной оптической активности (сравни кривые 2 и 3). Это означает, что если в данных условиях для формирования «зародыша» «возвратной» холестерической фазы из исходной гексагональной фазы (кривая 2) были необходимы энергетические затраты, то для ее роста дополнительных термоактивационных процессов не требуется (кривая 3). Одна из причин более высокого значения амплитуды аномальной полосы (по сравнению с «классическим» холестериком), регистрируемой после охлаждения дисперсии до 22°C , может состоять, согласно теоретическим расчетам [24], в уменьшении расстояния между соседними молекулами ДНК, упакованными при осмотическом давлении $11,33 \text{ атм.}$ в исходных частицах дисперсий.

На рисунке 4 приведены спектры КД дисперсии дц ДНК, сформированной при $C_{\text{ПЭГ}} = 300 \text{ мг мл}^{-1}$ (кривая 1; $\pi = 20,62 \text{ атм.}$, область **II**, рис. 1, б), при ее нагревании до 80°C (кривая 2) и последующем охлаждении до комнатной температуры (кривая 3). В этом случае у частиц дисперсии ДНК, практически не имевшей при комнатной температуре аномальной полосы в спектре КД (кривая 1), также появляется достаточно интенсивная аномальная полоса (рис. 4, кривая 2). Появление этой полосы означает, что при нагревании ЖКД также происходит фазовый переход «гексагональная упаковка» \rightarrow «возвратная» холестерическая упаковка» молекул ДНК в частицах дисперсий [24].

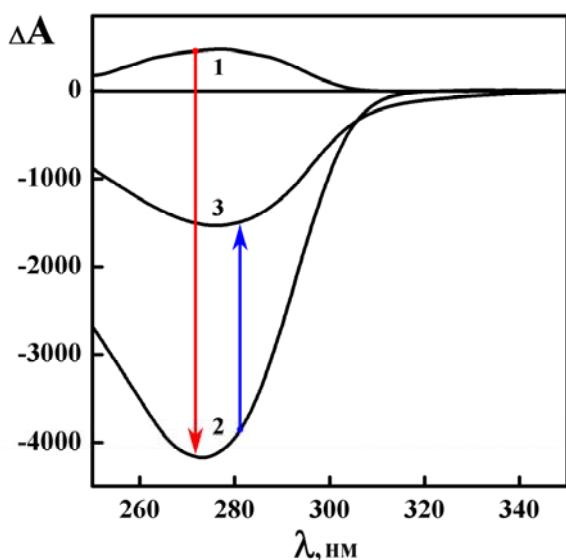


Рис. 4. Спектры КД исходной дисперсии ДНК, сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ при 22 °C (1), нагретой до 80 °C (2), а затем охлажденной до комнатной температуры (80 → 22 °C (3)).

$C_{\text{PEG}} = 300 \text{ мг мл}^{-1}$, $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкг мл}^{-1}$,
 $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+ \text{-фосфатный буфер}$,
 $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1 \text{ см}$.

Красная стрелка показывает изменение оптической активности исходной дисперсии ДНК при нагревании (22 → 80 °C), а синяя – при охлаждении (80 → 22 °C).

Fig. 4. CD spectra of the initial dispersion of DNA formed in water-salt solution of PEG at 22 °C (1), heated to 80 °C (2), and then cooled to room temperature (80 → 22 °C (3)).

$C_{\text{PEG}} = 300 \text{ mg ml}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$,
 $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+ \text{-phosphate buffer}$,
 $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ optical unit, $L = 1 \text{ cm}$.

The red arrow shows the change in the optical activity of the original DNA dispersion when heated (22 → 80 °C), and the blue arrow – when cooled (80 → 22 °C).

Следует обратить внимание на то, что достаточно близкое значение амплитуд равновесных аномальных полос при 80 °C (см. кривые 2 на рис. 3 и 4), может отражать тот факт, что расстояния между соседними молекулами ДНК в частицах дисперсий, сформированных при $C_{\text{PEG}} 240$ и 300 мг мл^{-1} ,

достаточно близки. При этом в отличие от частиц дисперсий с «возвратной» холестерической упаковкой, сформированных при осмотическом давлении раствора ПЭГ 11,33 атм. ($C_{\text{PEG}} = 240 \text{ мг мл}^{-1}$), охлаждение частиц сформированных при осмотическом давлении 20,62 атм. ($C_{\text{PEG}} = 300 \text{ мг мл}^{-1}$), сопровождается не **увеличением**, а **уменьшением** амплитуды аномальной полосы (рис. 4, кривая 3). Такое уменьшение амплитуды полосы в спектре КД может быть связано с процессом восстановления первоначальной гексагональной упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии. Это означает, что если для формирования «зародыша» «возвратной» холестерической фазы при $C_{\text{PEG}} = 300 \text{ мг мл}^{-1}$ были необходимы энергетические затраты, то восстановление первоначальной гексагональной упаковки молекул ДНК может происходить и при охлаждении дисперсии, т.е. этот процесс не требует таких затрат.

Приведенные на рис. 3 и 4 результаты показывают, что равновесные значения амплитуды аномальной полосы в спектре КД при 22 °C для частиц дисперсии с «возвратной» холестерической упаковкой молекул ДНК, сформированных при осмотическом давлении 11,33 атм. (рис. 3, кривая 3), и частиц с «возвратной» холестерической упаковкой, сформированных при давлении 20,62 атм. (рис. 4, кривая 3), реализуются в результате разнонаправленных процессов.

Изменение во времени аномальной полосы при охлаждении частиц дисперсий холестерической и «возвратной» холестерической фаз ДНК

На рисунке 5, а приведена кривая изменения во времени амплитуды аномальной полосы при охлаждении до 22 °C ПЭГ-содержащего раствора ($C_{\text{PEG}} = 170 \text{ mg ml}^{-1}$), в котором частицы холестерической фазы ДНК были нагреты до 80 °C. (Уменьшенная амплитуда полосы, достигнутая при нагревании дисперсии до 80 °C ($\Delta A_{270} \sim 1500 \times 10^{-6}$ оптич. ед.), отражает тот факт, что при этой температуре происходит раскручивание спиральной структуры частиц дисперсии).

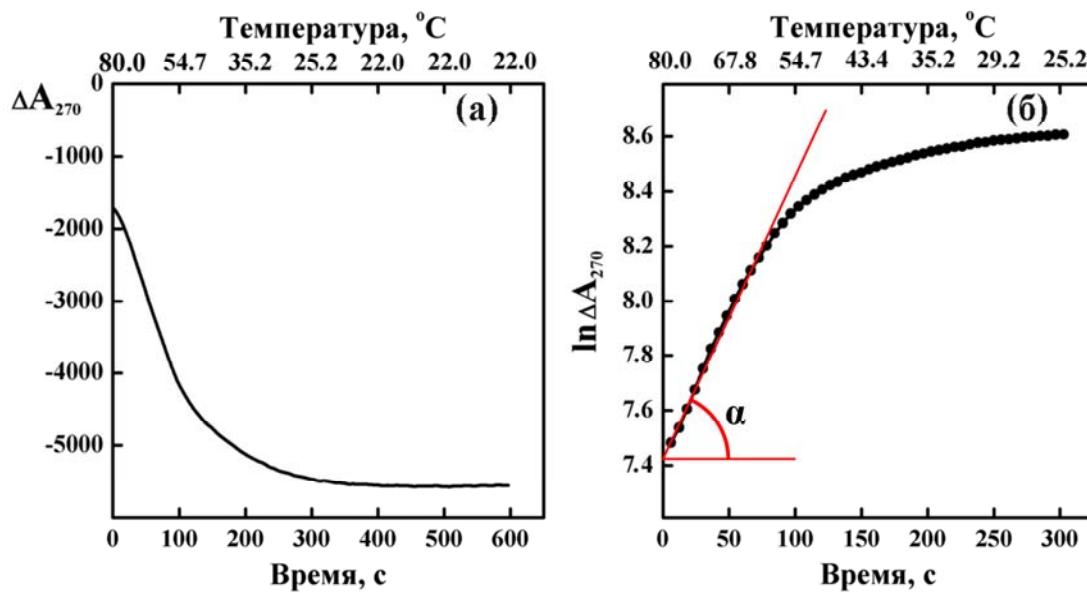


Рис. 5. Спектр КД жидкокристаллической дисперсии ДНК: *а* – кинетическая кривая изменения амплитуды полосы в спектре КД ($\lambda = 270$ нм) жидкокристаллической дисперсии ДНК ($C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг мл^{-1}) при ее охлаждении от 80 до 22 °С.

На верхней оси абсцисс приведены значения температуры, соответствующие временам, указанным на нижней оси. $C_{\text{ДНК}} = 10$ мкг мл^{-1} , 0,3 М $\text{NaCl} + 0,002$ М Na^+ -фосфатный буфер, $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1$ см;

б – кинетическая кривая, приведенная на рис. 5, *а*, представленная в координатах « $\ln\Delta A_{270}$ – Время».

На верхней оси абсцисс приведены значения температуры, соответствующие временам, величины которых указаны на нижней оси. Красными прямыми показан угол (*α*) между линейной частью графика и положительным направлением оси абсцисс, величина тангенса которого соответствует коэффициенту k в уравнении: $\ln\Delta A_{270} = kt + B$

Fig. 5. CD spectrum of the DNA liquid-crystalline dispersion: *a* – time dependence of the band amplitude in the CD spectrum ($\lambda = 270$ nm) of the DNA liquid-crystalline dispersion ($C_{\text{PEG}} = 170$ mg ml^{-1}) on cooling from 80 to 22 °C.

Temperature values corresponding to the time that is indicated on the lower axis are given on the upper abscissa axis.

$C_{\text{DNA}} = 10$ $\mu\text{g ml}^{-1}$, 0,3 M $\text{NaCl} + 0,002$ M Na^+ -phosphate buffer, $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ optical units, $L = 1$ cm;

b – the kinetic curve shown in Fig. 5, *a*, is represented in the “ $\ln\Delta A_{270}$ – Time” coordinates.

Temperature values corresponding to the time that is indicated on the lower axis are given on the upper abscissa axis. The red straight lines show the angle (*α*) between the graph linear part and the positive direction of the Time-axis, whose tangent corresponds to the coefficient k in the equation: $\ln\Delta A_{270} = kt + B$

При понижении температуры происходит улучшение упорядочения молекул ДНК в структуры холестерика. Этот процесс сопровождается уменьшением расстояния между соседними молекулами ДНК и увеличением угла закрутки между ними. В результате этих процессов амплитуда аномальной полосы в спектре КД **увеличивается**. Равновесное значение амплитуды ($\Delta A_{270} \sim 6000 \times 10^{-6}$ оптич. ед.) при понижении температуры достигается за 300–400 с.

Если предположить, что амплитуда аномальной полосы является однозначной функцией концентрации частиц, имеющих холестерическую

упаковку молекул ДНК, то процесс роста этой амплитуды может быть описан функцией типа $\ln\Delta A_{270} = kt + B$ (рис. 5, *б*). Это означает, что в случае «однородной» холестерической упаковки молекул ДНК в частицах, достигнутой в результате «термической тренировки», процесс увеличения аномальной активности описывается в рамках кинетического уравнения реакции первого порядка.

На рисунке 6, *а* показано временное изменение амплитуды аномальной полосы при охлаждении до 22 °С ПЭГ-содержащего раствора ($C_{\text{ПЭГ}} = 240$ мг мл^{-1}), в котором частицы «возвратной» холестерической фазы ДНК были сформированы

в результате нагревания частиц с гексагональной упаковкой до 80 °С. Приведенная кривая отличается по форме от кривой, характерной для частиц дисперсий ДНК с «однородной» холестерической упаковкой молекул (рис. 5, *a*, кривая 2). Видно, что в этом случае (рис. 6, *a*) при охлаждении частиц дисперсии амплитуда аномальной полосы **увеличивается** в течение 100 с, что свидетельствует о росте «возвратной» холестерической фазы. Однако вслед за этим происходит **уменьшение** амплитуды аномальной полосы. Равновесное значение ампли-

туды полосы ($\Delta A_{270} \sim 6000 \times 10^{-6}$ оптич. ед.) достигается после реализации какого-то процесса, связанного с уменьшением амплитуды полосы. Такой процесс отсутствует в первом случае, и сама кинетическая кривая начинает приобретать «волнообразный» характер.

Особенность кривой (рис. 6, *b*) состоит в том, что только на начальном участке кинетической кривой процесс увеличения аномальной оптической активности может быть описан функцией типа $\ln \Delta A_{270} = kt + B$.

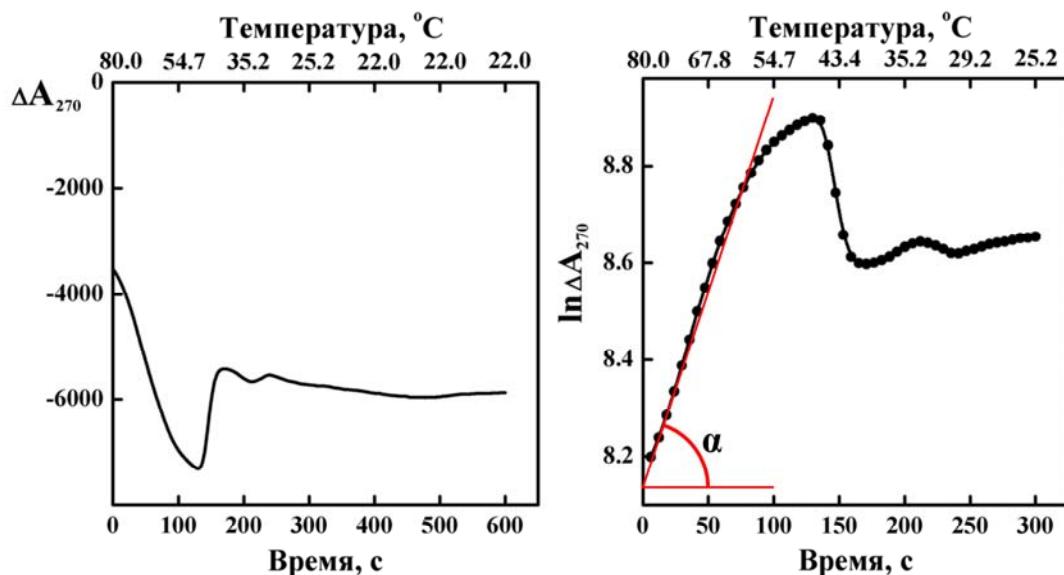


Рис. 6. Спектр КД жидкокристаллической дисперсии ДНК: *a* – Кинетическая кривая изменения амплитуды полосы в спектре КД ($\lambda = 270$ нм) жидкокристаллической дисперсии ДНК ($C_{\text{ПЭГ}} = 240$ мг мл^{-1}) при ее охлаждении от 80 до 22 °С.

На верхней оси абсцисс приведены значения температуры, соответствующие временам, указанным на нижней оси.

$C_{\text{ДНК}} = 10$ мкг мл^{-1} , 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер, $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1$ см;

b – кинетическая кривая, приведенная на рис. 6, *a*, представленная в координатах ($\ln(\Delta A_{270})$ – Время).

На верхней оси абсцисс приведены значения температуры, соответствующие временам, величины которых указаны на нижней оси. Красными прямыми показан угол (*α*) между линейной частью графика и положительным направлением оси абсцисс, величина тангенса которого соответствует коэффициенту k в уравнении $\ln \Delta A_{270} = kt + B$

Fig. 6. CD spectrum of the DNA liquid-crystalline dispersion: a – time dependence of the band amplitude in the CD spectrum ($\lambda = 270$ nm) of the DNA liquid-crystalline dispersion ($C_{\text{PEG}} = 240$ mg ml^{-1}) on cooling from 80 to 22 °C.

Temperature values corresponding to the time that is indicated on the lower axis are given on the upper abscissa axis.

$C_{\text{DNA}} = 10$ $\mu\text{g ml}^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -phosphate buffer, $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ optical units, $L = 1$ cm;

b – the kinetic curve shown in Fig. 6, *a*, is represented in the “ $\ln \Delta A_{270}$ – Time” coordinates.

Temperature values corresponding to the time that is indicated on the lower axis are given on the upper abscissa axis.

The red straight lines show the angle (*α*) between the linear part of the graph and the positive direction of the Time-axis, whose tangent corresponds to the coefficient k in the equation $\ln \Delta A_{270} = kt + B$

На рисунке 7, *a* показано изменение амплитуды аномальной полосы при охлаждении до 22 °С ПЭГ-содержащего раствора ($C_{\text{ПЭГ}} = 300 \text{ мг мл}^{-1}$), в котором частицы «возвратной» холестерической фазы ДНК были нагреты до 80 °С. Следует отметить, что в этом случае «возвратная» холестерическая фаза возникала в результате нагревания частиц с самой плотной гексагональной упаковкой молекул ДНК и поворота соседних молекул в «квазинематических» слоях на определенный угол [24]. При охлаждении полученных частиц диспер-

сии в течение первых 50–100 с угол закрутки соседних квазинематических слоев продолжает *увеличиваться*, что приводит к росту аномальной полосы. Процесс увеличения аномальной полосы может быть описан функцией типа $\ln\Delta A_{270} = kt + B$ лишь на начальном участке кривой (рис. 7, *b*). (Значения коэффициента k в уравнении $\ln\Delta A_{270} = kt + B$, численно равные величине тангенса угла наклона линейной части графиков, приведенных на рис. 5, *b*, 6, *b* и 7, *b*, сведены в таблицу).

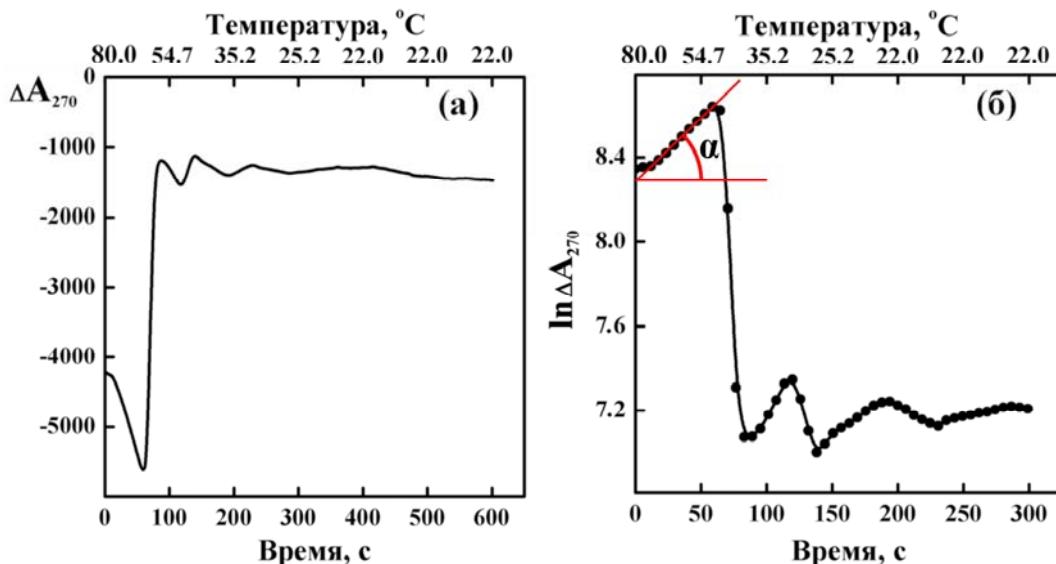


Рис. 7. Спектр КД жидкокристаллической дисперсии ДНК: *a* – кинетическая кривая изменения амплитуды полосы в спектре КД ($\lambda = 270 \text{ нм}$) жидкокристаллической дисперсии ДНК ($C_{\text{ПЭГ}} = 300 \text{ мг мл}^{-1}$) при ее охлаждении от 80 до 22 °С.

На верхней оси абсцисс приведены значения температуры, соответствующие временам, указанным на нижней оси. $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкг/мл}, 0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+ \text{-фосфатный буфер}, \Delta A_{270} \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1 \text{ см}$;

b – кинетическая кривая, приведенная на рис. 7, *a*, представленная в координатах ($\ln(\Delta A_{270})$ – Время).

На верхней оси абсцисс приведены значения температуры, соответствующие временам, величины которых указаны на нижней оси. Красными прямыми показан угол (*α*) между линейной частью графика и положительным направлением оси абсцисс, величина тангенса которого соответствует коэффициенту k в уравнении: $\ln\Delta A_{270} = kt + B$.

Fig. 7. CD spectrum of the DNA liquid-crystalline dispersion: a – time dependence of the band amplitude in the CD spectrum ($\lambda = 270 \text{ nm}$) of the DNA liquid-crystalline dispersion ($C_{\text{PEG}} = 300 \text{ mg ml}^{-1}$) on cooling from 80 to 22 °C.

Temperature values corresponding to the time that is indicated on the lower axis are given on the upper abscissa axis.

$C_{\text{DNA}} = 10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}, 0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+ \text{-phosphate buffer}, \Delta A_{270} \times 10^{-6}$ optical units, $L = 1 \text{ cm}$;

b – the kinetic curve shown in Fig. 7, *a*, represented in the “ $\ln\Delta A_{270}$ – Time” coordinates.

Temperature values corresponding to the time that is indicated on the lower axis are given on the upper abscissa axis.

The red straight lines show the angle (*α*) between the linear part of the graph and the positive direction of the Time-axis, whose tangent corresponds to the coefficient k in the equation: $\ln\Delta A_{270} = kt + B$.

Таблица. Значения коэффициента k в уравнении $\ln\Delta A_{270} = kt + B$, численно равные величине тангенса угла наклона линейной части графиков, приведенных на рис. 5, б, 6, б и 7, б

Table. Coefficient k values in the equation $\ln\Delta A_{270} = kt + B$, numerically equal to the tangent of the angle of inclination of the linear part of the graphs shown in figs. 5, б, 6, б and 7, б

№	СпЭГ, мг/мл	$k, \text{с}^{-1}$
1	170	$10,3 \times 10^{-3}$
2	240	$8,3 \times 10^{-3}$
3	300	$6,3 \times 10^{-3}$

Вслед за этим следует *резкое уменьшение* амплитуды аномальной полосы в спектре КД, и система стремится к состоянию равновесия. Такое поведение свидетельствуют, о том, что структура возвратной холестерической фазы не описывается простой ортогональной холестерической спиралью с постоянным шагом. Структура возвратной фазы значительно более сложная и многопараметрическая (включает много гармоник в неоднородно закрученном ориентационном состоянии). Уменьшение амплитуды аномальной полосы до равновесного значения происходит в результате того или иного дополнительного процесса структурной релаксации, связанного с изменением кругового диэлектрического диполя. Меняющиеся со временем параметры этой структурной релаксации приводят к немонотонной (затухающие и нерегулярные осцилляции) по времени кинетике изменения кругового диэлектрического диполя.

Следует отметить, что в случае частиц с «возвратной» холестерической упаковкой молекул ДНК «нелинейные» изменения амплитуды аномальной полосы развиваются после 50–100 с. (Экспериментальная кривая понижения температуры в кювете носит однородный характер (данные не приведены).

Таким образом, при охлаждении переход в равновесное состояние частиц дисперсий с «возвратной» холестерической упаковкой молекул ДНК носит значительно более сложный характер, чем в случае частиц дисперсии с «классической» холестерической упаковкой молекул ДНК.

Обсуждение результатов

При использованной нами схеме формирования ЖКД ДНК, включающей стадию быстрого смешения разбавленного раствора ДНК и раствора

ПЭГ с высокой концентрацией, упаковка полужестких линейных молекул ДНК в частицах дисперсий определяется латеральным взаимодействием соседних молекул «в момент» их сближения. Экранировка зарядов ДНК и осмотическое давление раствора ПЭГ ускоряют «сближение» молекул ДНК и их одномерное упорядочение. Сочетание таких условий, как минимизация свободного объема линейных дц молекул ДНК и необходимость в максимально плотной упаковке наибольшего числа молекул ДНК в малом объеме частицы дисперсии, определяет стремление этих молекул к параллельному (нematicескому, ориентационному) расположению в частице дисперсии и к их ближней позиционной (трансляционной) гексагональной упаковке. В этой структуре, так же как и в случае гексагональной фазы, образуемой в результате увеличения концентрации ДНК в водно-солевом растворе, можно, следуя авторам работ [25, 26], выделить «слои» из молекул, одинаково упорядоченных в пространстве. Молекулы ДНК лежат в плоскости «слоев», расположенных на расстоянии d , толщина которых приблизительно равна расстоянию между молекулами ДНК. Тот факт, что ориентация молекул в каждом «слое» подобна таковой в нематических жидкких кристаллах, послужил основанием для использования термина «квазинематический слой» для его обозначения [25].

Наличие у дц молекул ДНК набора анизотропных свойств (спиральная структура молекул, спиральное расположение противоионов, асимметрия С-атомов сахарных остатков) предопределяет еще одну тенденцию молекул ДНК, а именно тенденцию к пространственной закрутке этих молекул в частицах. Это связано с тем, что если при большом расстоянии между молекулами ДНК взаимодействие между ними может быть описано как взаимодействие между гомогенно заряженными палочками, то при уменьшении расстояния до 5,0 нм (и менее), происходящем при увеличении осмотического давления раствора ПЭГ, вклад во взаимодействие начинает вносить так называемое «хиральное взаимодействие», обусловленное хиральными свойствами как самих молекул ДНК, так и хиральностью межмолекулярных взаимодействий. Основной эффект от хиральности состоит в том, что хиральные молекулы не стремятся упаковываться параллельно по отношению к своим соседям. Минимум энергии достигается при некотором взаимном повороте соседних молекул, т. е.

хиральность способствует макроскопической закрутке молекул с характерным шагом [27, 28].

Следовательно, при образовании частиц ЖКД возникает конкуренция между энергетическим вкладом, обусловленным параллельным упорядочением молекул ДНК в частицах дисперсии (E_1), связанным со «сжимающим» осмотическим давлением раствора ПЭГ, и энергетическим вкладом, обусловленным закруткой этих молекул в пространстве (E_2), который связан с их хиральностью. Хиральные эффекты наиболее заметны на таких расстояниях между молекулами ДНК, при которых энергия взаимодействия ближайших соседей превышает тепловую энергию (можно сказать, что молекулы «чувствуют» друг друга). Величина и знак хирального вклада могут зависеть как от небольших изменений структуры ДНК, так и от температуры.

При определенном сочетании вкладов, обусловленных параллельным квазинематическим ориентационным упорядочением и хиральным взаимодействием в суммарную энергию взаимодействия молекул ДНК (E), происходит спиральная пространственная (холестерическая) закрутка «квазинематических» слоев из молекул ДНК, упакованных в частицах дисперсии.

Если исходить из представления о расположении молекул ДНК в «квазинематических» слоях частицы дисперсии, то появление аномальной полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований ДНК ($\lambda \sim 270$ нм) отражает факт формирования пространственной спирально закрученной структуры, содержащей эти основания. Поскольку азотистые основания жестко фиксированы в структуре молекул ДНК и ориентированы перпендикулярно длинной оси молекул ДНК, спиральная структура может возникнуть только в результате поворота соседних «квазинематических» слоев из молекул ДНК на определенный угол относительно друг друга. Ось вращения слоев ориентирована перпендикулярно плоскости поворота слоев.

Холестерическая упаковка молекул ДНК в частицах ЖКД «проявляется» как аномальная полоса в спектре КД. Нужно иметь в виду, что если молекулы в частицах ЖКД вращаются вокруг своих осей независимо друг от друга, то их хиральные взаимодействия зануляются при усреднении по молекулярным ориентациям. Для проявления хирального взаимодействия необходима пространственная «корреляция» в расположении соседних молекул ДНК [27, 29].

Для ЖК-фаз, сформированных из частиц дисперсии с холестерической упаковкой молекул ДНК (область I), характерен размытый пик на краевой малоуглового рассеяния рентгеновых лучей. Такая размытость пика может быть следствием малого размера кристаллитов, рассеивающих рентгеновское излучение, или того, что кристаллиты ориентированы нерегулярно относительно друг друга [30]. Эти данные свидетельствуют о высокой степени «подвижности» упаковки соседних молекул ДНК при их холестерической упаковке. Нагревание дисперсии с холестерической упаковкой молекул ДНК приводит к повышению температурной диффузии соседних молекул ДНК и к улучшению их пространственного расположения в частице дисперсии. Это означает, что в случае достаточно больших расстояний между молекулами ДНК повышение температуры ЖК-дисперсии сопровождается более однородным (регулярным) расположением соседних молекул ДНК в частицах дисперсии.

Действительно, уменьшение амплитуды аномальной полосы в спектре КД при нагревании ЖКД, сформированных в области I (рис. 2, кривая 2), отражает уменьшение угла закрутки соседних «квазинематических» слоев и раскручивание спиральной структуры частиц дисперсии, т. е. происходит своеобразная «нематизация» системы. В этих условиях вклад хирального взаимодействия между молекулами ДНК в общую энергию стабилизации частиц ЖКД уменьшается.

С другой стороны, охлаждение частиц дисперсий, сформированных в области I, приводит к уменьшению расстояния между молекулами ДНК. В этих условиях вклад хирального взаимодействия в общую энергию стабилизации частиц ЖКД увеличивается и аномальная полоса в спектре КД возрастает (рис. 2, кривая 3). Чем больше угол поворота «квазинематических» слоев, тем более интенсивной является аномальная полоса в спектре КД частиц ЖКД ДНК.

Как следует из рис. 2, при $C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг мл^{-1} в условиях одномерного (регулярного) расположения соседних молекул ДНК в частицах дисперсии энергетический вклад хирального взаимодействия в общую энергию стабилизации частиц ЖКД (E_2) всегда превышает вклад, обусловленный одномерным упорядочением молекул ДНК в частицах дисперсии (E_1). Именно поэтому процесс увеличения аномальной полосы в спектре КД при охлаждении полученной системы носит одностадийный характер (рис. 5,

кривая 1) и описывается в рамках простого уравнения ($\ln \Delta A_{270} = kt + B$). Это означает, что если для формирования «однородной» холестерической структуры были необходимы энергетические затраты (в частности, за счет увеличения температуры), то для перехода этой структуры в более упорядоченную (по сравнению с исходной) холестерическую дополнительных термоактивационных процессов не требуется.

Следует отметить, что такой характер изменения аномальной полосы в спектре КД частиц ЖКД ДНК при нагревании и охлаждении специфичен для «классических» холестериков, формируемых в области I.

С учетом вышесказанного рассмотрим появление аномальной оптической активности при нагревании частиц дисперсий, сформированных в области II. Поскольку взаимная укладка молекул почти всегда подчиняется принципу плотной упаковки, который можно рассматривать в первом приближении как геометрическое стремление молекул к минимуму энергии [2, 31, 32], следует ожидать, что максимальная плотность упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии, образующихся в результате фазового исключения этих молекул из водно-солевых растворов ПЭГ с высоким осмотическим давлением, должна быть достигнута при их гексагональной упаковке.

Частицы дисперсии ДНК, сформированной в области II, имеют один узкий пик на кривых малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Рост осмотического давления ПЭГ (область II) приводит к уменьшению расстояния между молекулами ДНК в «квазинематических» слоях. Расстояние d уменьшается от $\sim 3,0$ до $\sim 2,5$ нм при увеличении осмотического давления [24]. Действительно, согласно литературным данным [20, 33] величина d , равная 2,6 нм, вполне соответствует гексагональной упаковке молекул ДНК в ЖК-фазах. Это означает, что плотность упаковки молекул ДНК возрастает и размер кристаллитов заметно увеличивается.

Очевидно, что увеличение температуры приводит к росту диффузионной подвижности молекул ДНК в частицах ЖКД. Несмотря на малое расстояние между «квазинематическими» слоями, гексагональная упаковка становится лабильной и (при отсутствии других внешних воздействий) система хотела бы перейти в изотропное состояние (т. е. должно было бы произойти «плавление» гексагональной структуры). Поскольку в нашем случае переход молекул ДНК в изотропное состоя-

ние невозможен по стерическим причинам («сжимающее» действие раствора ПЭГ удерживает молекулы ДНК в пределах частицы), можно ожидать, что вместо «плавления» гексагональной структуры может произойти другой фазовый переход. Действительно, при некоторой «характерной» температуре ПЭГ-содержащего раствора амплитуда диффузионных смещений соседних молекул ДНК в гексагональной фазе достигает некоторой величины, составляющей «критическую» долю [34–36] от среднего расстояния между молекулами ДНК.

В условиях повышенной диффузионной подвижности молекул ДНК появляется возможность для флуктуационного сближения соседних молекул в одном «квазинематическом» слое и «корреляционного взаимодействия» как между молекулами в плоскости этого слоя, так и между молекулами соседних слоев [28]. В результате изменения характера хирального взаимодействия между молекулами ДНК соседних слоев может произойти поворот этих молекул в пространстве [24]. Возникает пространственная структура, которая становится основой для формирования «зародыша» (ядра) новой фазы. Рост зародыша до критического размера будет обеспечивать условия, необходимые для формирования новой фазы из метастабильной гексагональной фазы; в частности, это может быть переход в спирально закрученную холестерическую фазу («возвратную» холестерическую фазу).

Важную роль в повороте соседних квазинематических слоев ДНК, необходимом для возникновения «возвратной» холестерической фазы, играет плотность упаковки молекул в частице, определяющая характер взаимодействия между молекулами ДНК. При комнатной температуре и весьма малом расстоянии в частицах ДНК с гексагональной упаковкой молекул энергия их одномерного упорядочения, обусловленная «сжимающим» действием раствора ПЭГ, всегда больше энергии хирального взаимодействия этих молекул. В этих условиях поворот соседних молекул невозможен или такой поворот может носить локальный характер, не реализуемый в пределах всей частицы дисперсии.

Аномальная полоса в спектре КД у частиц дисперсий ДНК, сформированных в области II, появляется при определенной температуре, т. е. температура контролирует характер упаковки соседних, линейных, полужестких дц молекул ДНК в частицах дисперсии.

Охлаждение после нагревания (рис. 3) «возвратной» холестерической фазы, сформированной из частиц с гексагональной упаковкой при осмотическом давлении 11,33 атм., сопровождается дальнейшим ростом аномальной оптической активности. Это означает, что если для формирования «зародыша» новой фазы были необходимы энергетические затраты, то для роста «возвратной» холестерической фазы дополнительных термоактивационных процессов не требуется. Следует обратить внимание на то, что такой характер изменения аномальной оптической активности в случае «возвратной» холестерической фазы аналогичен изменению свойств «классических» холестериков, формируемых в области I.

Однако в условиях более высокого осмотического давления (область II), когда расстояние между молекулами ДНК уменьшается, наблюдаются различия в свойствах частиц дисперсий.

Рисунок 7 показывает, что дисперсия ДНК, сформированная при высоком осмотическом давлении ($\pi = 20,62$ атм.), не имеет аномальной полосы в спектре КД. Это связано с тем, что при таком осмотическом давлении раствора ПЭГ расстояние между слоями из молекул ДНК составляет 2,6 нм и латеральное взаимодействие между соседними молекулами при комнатной температуре обеспечивает их гексагональную упаковку в частицах дисперсии. В этих условиях плотная упаковка соседних молекул ДНК влияет на возможность пространственного поворота «квазинематических» слоев, т. е. вклад хирального взаимодействия между молекулами ДНК в образованной частице дисперсии в общую энергию стабилизации этой частицы является незначительным.

Можно сказать, что чем выше осмотическое давление ПЭГ-содержащего раствора, тем выше тенденция хиральных молекул ДНК к гексагональной, а не холестерической упаковке. Другими словами, энтропия упаковки полужестких, линейных дц молекул ДНК может превышать энергетический вклад, обусловленный хиральными свойствами этих молекул.

Нагревание дисперсии ДНК, сформированной при высоком осмотическом давлении (рис. 3 и 4), сопровождается появлением аномальной полосы в спектре КД, т. е. появлением «возвратной» холестерической упаковки молекул ДНК.

Анализ температурного поведения малоуглового рефлекса, проведенный в качестве примера на фазе, сформированной при $C_{\text{ПЭГ}} = 300 \text{ мг} \text{ ml}^{-1}$

[24], свидетельствует о весьма малом изменении положения этого рефлекса (от 2,5 до 2,64 нм) при нагревании от 22 до 80 °C и о полном восстановлении положения пика при охлаждении до 22 °C. Таким образом, результаты рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами свидетельствуют о практической неизменности высокой степени упорядоченности дц молекул ДНК в частицах дисперсии, сформированных при высоком осмотическом давлении раствора ПЭГ. Увеличение осмотического давления приводит к появлению различий в свойствах частиц «возвратной» холестерической фазы, которые сформированы в области II.

Полученные нами результаты показывают, что как при комнатной, так и при повышенной температуре растворов ПЭГ с осмотическим давлением вплоть до 10 атм. величина холестерического вклада (E_2) в энергию стабилизации частиц ЖКД ДНК всегда превышает вклад, обусловленный одномерным упорядочением этих молекул в частицах дисперсии (E_1). В этих условиях для частиц ДНК характерна холестерическая упаковка молекул, и при понижении температуры происходит «плавное» улучшение свойств частиц с холестерической упаковкой (рис. 5).

При осмотическом давлении растворов ПЭГ выше 10 атм., ситуация меняется; величина E_1 превышает величину E_2 при комнатной температуре, и для частиц ДНК характерна гексагональная упаковка молекул. При повышенной температуре гексагональная упаковка может измениться на холестерическую в случае частиц, сформированных при осмотическом давлении более 10 атм., т.е. величина E_2 может превысить величину E_1 .

Кинетические кривые (рис. 6 и 7) для частиц с «возвратной» холестерической упаковкой молекул ДНК отличаются по своему характеру от кривых с «однородной» холестерической упаковкой (рис. 5). Изменение характера кинетических кривых тем заметнее, чем выше осмотическое давление раствора ПЭГ или, другими словами, чем выше плотность упаковки молекул ДНК в частице дисперсии. Это позволяет предположить, что отмеченные различия связаны с существованием каких-то процессов в самих частицах, обусловленных, по-видимому, особенностями пространственной структуры частиц.

Кинетические кривые, зарегистрированные при охлаждении частиц с «возвратной» холестерической упаковкой, показывают, что в зависимости от конкретного расстояния между молекулами

ДНК, определяющего соотношение между величинами E_1 и E_2 , этот процесс происходит по-разному. В частности, аномальная оптическая активность «возвратной» холестерической фазы ДНК, сформированной из частиц с гексагональной упаковкой при осмотическом давлении 11,33 атм., **увеличивается** при охлаждении. Аномальная оптическая активность «возвратной» холестерической фазы ДНК, сформированной из частиц с гексагональной упаковкой при осмотическом давлении 20,62 атм., **уменьшается** при охлаждении. Это означает, что при увеличении осмотического давления раствора ПЭГ, т. е. роста величины E_1 , и уменьшении хирального взаимодействия между молекулами ДНК, т. е. уменьшения E_2 , «возвратная» холестерическая фаза стремится перейти в исходную гексагональную фазу (рис. 5, кривые 2–3). Такое различие в свойствах «возвратных» холестерических фаз показывает, что структура «возвратной» холестерической фазы ДНК является «напряженной» (с ненулевыми внутренними напряжениями) и она зависит от расстояния между «квазинематическими» слоями. Именно поэтому кинетические кривые изменения аномальной полосы в спектре КД приобретают немонотонный «волнообразный» характер (рис. 6 и 7) только в случае частиц с «возвратной» холестерической упаковкой.

В условиях разного осмотического давления раствора ПЭГ проявляется дуализм действия температуры. С одной стороны, повышенная температура необходима для образования «зародыша» «возвратной» холестерической фазы. С другой стороны, температура увеличивает ориентационные флуктуации в соседних «квазинематических» слоях, что препятствует их упорядоченному пространственному расположению в структуре частиц дисперсии. В этих условиях важную роль играет расстояние между «квазинематическими» слоями из молекул ДНК, определяющее возможность их скоординированного поворота в частице дисперсии и увеличения размера холестерической структуры «возвратной» фазы. Понижение температуры, когда возрастают осмотическое давление раствора и уменьшается диффузионная подвижность соседних молекул ДНК, может не сопровождаться мгновенным, точным пространственным упорядочением соседних «квазинематических» слоев из молекул ДНК. Это может приводить к их «замораживанию» в пределах сформированной

«возвратной» холестерической структуры. Поэтому при понижении температуры переход в исходную гексагональную структуру может приобретать сложный характер, как в связи кинетическими причинами, так и в связи с изменением характера взаимодействия между соседними молекулами ДНК.

Сопоставление кинетических кривых, приведенных на рис. 5 и рис. 6–7, показывает, что рост осмотического давления сопровождается усилением «волнообразного» характера кинетических кривых. Такой характер кривых подтверждает наличие в частицах «возвратной» холестерической фазы участков с разной плотностью упаковки молекул ДНК, что приводит к разным кинетическим процессам при переходе от «возвратной» холестерической упаковки молекул ДНК к их равновесной упаковке.

Следовательно, несмотря на общий гексагональный характер упаковки молекул ДНК в частицах ЖКД в области II, появление «возвратных» холестерических фаз с разными свойствами указывает на то, что формирование «возвратных» холестерических фаз ДНК определяется не только осмотическим давлением раствора ПЭГ и его температурой, но также и характерным средним расстоянием между молекулами ДНК в частицах с гексагональной ориентационной упаковкой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-00041-П; Ю.М.Е., С.Г.С., В.И.С., О.Н.К.)

Список литературы / References

1. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I., Semenov S.V., Kats E.I. Liquid-crystalline dispersions of double-stranded DNA. *Crystals*, 2019, **9** (3), Article number: 162. **DOI:** 10.3390/cryst9030162.
2. Goldar A., Thomson H., Seddon J.M. Structure of DNA cholesteric spherulitic droplet dispersions. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2007, **20** (3), 035102 (9 p.). **DOI:** 10.1088/0953-8984/20/03/035102.
3. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Semenov S.V., Skuridin S.G. DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanoconstructions. Boca Raton, London, New York: CRC Press (Taylor & Francis Group), 2012, 258 p.
4. Biswas N., Ichikawa M., Datta A., Sato Y.T., Yanagisawa M., Yoshikawa K. Phase separation in crowded micro-spheroids: DNA-PEG system. *Chem. Phys. Lett.*, 2012, **539–540**, 157–162. **DOI:** 10.1016/j.cplett.2012.05.033.

5. Adamczyk A. Phase transition in freely suspended smectic droplets. Cotton-Mouton technique, architecture of droplets and formation nematoids. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1989, **170** (1), 53–69.
DOI: 10.1080/00268948908047747.
6. Chiccoli C., Pasini P., Semeria F., Zannoni C. Computer simulations of nematic droplets with toroidal boundary conditions. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1992, **221** (1), 19–28. **DOI:** 10.1080/10587259208037516.
7. Urbanski M., Reyes C.G., Noh J., Sharma A., Geng Y., Subba Rao Jampani V., Lagerwall J.P. Liquid crystals in micron-scale droplets, shells and fibers. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2017, **29** (13) 133003.
DOI: 10.1088/1361-648X/aa5706.
8. Bouligand Y. Liquid crystals and their analogues in biological systems. *Liquid Crystals. Solid State Phys.* / Ed. by L. Liébert. New York: Academic Press, 1978, Suppl. **14**, 259–294.
9. Chow M.H., Yan K.T.H., Bennett M.J., Wong J.T.Y. Birefringence and DNA condensation of liquid crystalline chromosomes. *Eukaryot. Cell*, 2010, **9** (10), 1577–1587. **DOI:** 10.1128/EC.00026-10.
10. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I., Kats E.I. Anomalous behavior of the DNA liquid-crystalline dispersion particles and their phases. *Chem. Phys. Lett.*, 2018, **707** (9), 154–159.
DOI: 10.1016/j.cplett.2018.07.028.
11. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I., Bobrov Yu.A., Bucharsky V.A., Kats E.I. New optical evidence of the cholesteric packing of DNA molecules in “re-entrant” phase. *Chem. Phys. Lett.*, 2019, **717** (1), 59–68. **DOI:** 10.1016/j.cplett.2019.01.017.
12. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Skuridin S.G., Semenov S.V., Kompanets O.N. The CD Spectra of Double-Stranded DNA Liquid Crystalline Dispersions. New York: Nova Science Publisher, 2011, 103 p.
13. Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco I. Physical Chemistry of Nucleic Acids. New York: Harper & Row, 1974, 517 p.
14. Tinoco I., Bustamante C., Maestre M.F. The optical activity of nucleic acids and their aggregates. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1980, **9** (1), 107–141.
DOI: 10.1146/annurev.bb.09.060180.000543.
15. Skuridin S.G., Damaschun H., Damaschun G., Yevdokimov Y.M., Misselwitz R. Polymer condensed DNA: study by small-angle X-ray scattering, intermediate-angle X-ray scattering, and circular dichroism spectroscopy. *Stud. Biophys.*, 1986, **112** (2/3), 139–150.
16. Семенов С. В., Евдокимов Ю. М. Круговой дихроизм частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК // *Биофизика*. 2015. Т. 60, №. 2. С. 242–252. [Semenov S.V., Yevdokimov Yu.M. Circular dichroism of DNA liquid-crystalline dispersion particles. *Bio-physics*, 2015, **60** (2), 188–196.
DOI: 10.1134/S0006350915020177].
17. Livolant F., Maestre M.F. Circular dichroism microscopy of compact forms of DNA and chromatin in vivo and in vitro: cholesteric liquid-crystalline phases of DNA and single dinoflagellate nuclei. *Biochemistry*, 1988, **27** (8), 3056–3068. **DOI:** 10.1021/bi00408a058.
18. Сонин А. С. Введение в физику жидкких кристаллов. М. : Наука, 1983. 320 с. [Sonin A.S. Introduction to the Physics of Liquid Crystals. Moscow : Nauka, 1983, 320 p. (in Russ.)].
19. Sundaresan N., Thomas T., Thomas T.J., Pillai C.K. Lithium ion induced stabilization of liquid crystalline DNA. *Macromol. Biosci.*, 2006, **6** (1), 27–32.
DOI: 10.1002/mabi.200500145.
20. Livolant F., Levelut A.M., Doucet J., Benoit J.P. The highly concentrated liquid-crystalline phase of DNA is columnar hexagonal. *Nature*, 1989, **339** (6227), 724–726. **DOI:** 10.1038/339724a02739717.
21. Rill R.L., Strzelecka T.E., Davidson M.W., van Winkle D.H. Ordered phases in concentrated DNA solutions. *Phys. A*, 1991, **176** (1), 87–116.
DOI: 10.1016/0378-4371(91)90435-F.
22. Livolant F. Supramolecular organization of double-stranded DNA molecules in the columnar hexagonal liquid crystalline phase. An electron microscopic analysis using freeze-fracture methods. *J. Mol. Biol.*, 1991, **218** (1), 165–181.
DOI: 10.1016/0022-2836(91)90882-7.
23. Kassapidou K., Jesse W., van Dijk J.F., van der Maarel J.R. Liquid crystal formation in DNA fragment solutions. *Biopolymers*, 1998, **46** (1), 31–37.
DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(199807)46:1<31::AID-BIP3>3.0.CO;2-Z.
24. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Semenov S.V., Dadinova L.A., Salyanov V.I., Kats E.I. Re-entrant cholesteric phase in DNA liquid-crystalline dispersion particles. *J. Biol. Phys.*, 2017, **43** (1), 45–68.
DOI: 10.1007/s10867-016-9433-4.
25. Чилая Г. С. Лисецкий Л. Н. Спиральное закручивание в холестерических мезофазах // *Успехи физ. наук*. 1981. Т. 134, № 2. С. 279–304. [Chilaya G.S., Lisetskii L.N. Helical twist in cholesteric mesophases. *Sov. Phys. Usp.*, 1981, **24** (6), 496–510.
DOI: 10.1070/PU1981v024n06ABEH004849].
26. Chandrasekhar S. Liquid Crystals: 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, 480 p.
DOI: 10.1080/13583149308628627.
27. Harris A.B., Kamien R.D., Lubensky T.C. Molecular chirality and chiral parameters. *Rev. Modern Phys.*, 1999, **71** (5), 1745–1757.
DOI: 10.1103/RevModPhys.71.1745.
28. Kornyshev A.A., Lee D.J., Leikin S., Wynveen A., Zimmerman S.B. Direct observation of azimuthal correlations between DNA in hydrated aggregates. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **95** (14), 148102.
DOI: 10.1103/PhysRevLett.95.148102.

29. Нечипуренко Ю.Д., Стрельцов С.А., Евдокимов Ю.М. Термодинамическая модель образования мостиков между молекулами нуклеиновых кислот в жидкокристалле // *Биофизика*. 2001. Т. 46, № 3. С. 428–435. [Nechipurenko Yu.D., Strel'tsov S.A., Yevdokimov Yu.M. A thermodynamic model of the formation of bridges between nucleic acid molecules in a liquid crystal. *Biophysics*, 2001, **46** (3), 428–435. **PMID:** 11449541.]
30. Вайнштейн Б. К. Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах. М. : Изд-во АН СССР, 1963. 371 с. [Vainshtein B.K. Diffraction of X-rays by chain molecules. Moscow : USSR Academy of Sciences Publisher, 1963, 371 p. (in Russ.)].
31. Strey H.H., Parsegian V.A., Podgornik R. Equation of state for DNA liquid crystals: fluctuation enhanced electrostatic double layer repulsion. *Phys. Rev. Lett.*, 1997, **78** (5), 895–898. **DOI:** 10.1103/PhysRevLett.78.895.
32. Leonard M., Hong H., Easwar N., Strey H.H. Soft matter under osmotic stress. *Polymer*, 2001 **42** (13), 5823–5827. **DOI:** 10.1016/S0032-3861(00)00903-4.
33. Livolant F., Leforestier A. Condensed phases of DNA: structures and phase transitions. *Prog. Polym. Sci.*, 1996, **21** (6), 1115–1164. **DOI:** 10.1016/S0079-6700(96)00016-012.
34. Lindemann F.A. Über die berechnung molekularer eigenfrequenzen. *Phys. Z.*, 1910, **14**, 609–612.
35. Lifshitz I.M., Slyozov V.V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *J. Phys. Chem. Solids*, 1961, **19** (1–2), 35–50. **DOI:** 10.1016/0022-3697(61)90054-3.
36. Boudet A., Binet C., Mitov M., Bourgerette C., Boucher E. Microstructure of variable pitch cholesteric films and its relationship with the optical properties. *Eur. Phys. J. E*, 2000, **2** (3), 247–253. **DOI:** 10.1007/PL00013671.

Поступила в редакцию 20.06.2019 г.
Received 20 June 2019