

© П. О. Вардеванян, А. Т. Карапетян, Г. А. Терзикян,
Р. Р. Вардапетян, Э. А. Даниелян, 1990

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ КРИВЫЕ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК: ДОСТОВЕРНОСТЬ НАЛИЧИЯ ЭКСТРЕМУМОВ

Предложен метод, позволяющий выявить экстремумы на дифференциальной кривой плавления, которые строго определены набором исходных данных. Единственным условием для его использования является предположение о существовании второй производной кривой плавления.

Введение. Развитие методов выделения и очистки ДНК, разработка приемов определения нуклеотидной последовательности, а также увеличение чувствительности и точности оптических измерений открыли большие возможности в области изучения перехода спираль — клубок в ДНК. Оказалось, что кривые плавления фаговых и плазмидных ДНК имеют тонкую структуру плавления [1—4]. Особенности наблюдаются и на кривых плавления ДНК высших организмов [5, 6]. Каждая природная ДНК имеет свой характерный профиль плавления. Это стало ясно после того, как появилась возможность представлять кривые плавления в дифференциальной форме [2—4].

Дифференциальные кривые плавления (ДКП) можно получить путем прямого [6, 7] и численного дифференцирования [8, 9]. Из-за методических трудностей, связанных с прямым дифференцированием, большее распространение в настоящее время получили численные методы. Однако и последние не лишены существенных недостатков, заключающихся в том, что численное дифференцирование может приводить либо к потере некоторых пиков на ДКП, особенно тех, ширина профиля которых достаточно мала, либо к появлению новых (физически нереальных) пиков за счет неудачного подбора степени сглаживающего многочлена.

В настоящей работе предлагается метод, основанный лишь на анализе экспериментальных данных и позволяющий частично устранить отмеченные недостатки.

Материалы и методы. Использовали препараты синтетической поли(d[A-T]) фирмы «Boehringer Mannheim GmbH» (ФРГ) и высокополимеризованной нативной ДНК тимуса теленка фирмы «Sigma» (США). Кривые плавления получали на спектрофотометре Unicam SP-8-100. Нагрев осуществляли с помощью температурного программника SP-876 Series-2 с линейной скоростью нарастания 0,1 град/мин. Поглощение регистрировали при $\lambda=268$ нм на программируемом калькуляторе HP-97S 1/0. Точность регистрации температуры составляла $\pm 0,025$ °C, оптической плотности $\pm 5 \cdot 10^{-4}$. Растворы готовили на дважды дистиллированной деионизированной воде. Образцы ДНК анализировали против 0,1XSSC, содержащего 0,1 мМ ЭДТА. Концентрация ДНК в образцах составляла 0,5—0,6 ОЕ/мл. В кювете сравнения параллельно нагревали чистый растворитель. Использовали односантиметровые кюветы объемом 1 мл с тефлоновыми пробками. Во избежание испарения пробки смазывали вакуумной смазкой. Температуру измеряли непосредственно в кюветах платиновым резистором.

Частота регистрации в случае поли(d[A-T]) составляла 0,033 град, а в случае ДНК тимуса теленка — 0,098 град. Дифференцирование проводили на ЭВМ «Электроника-60» по специально составленной программе.

Описание математической модели. Пусть функция $f(x)$ определена и дважды непрерывно дифференцируема на конечном промежутке $[a, b]$. Предположим, что заданы приближенные значения функции $f(x) = y_k + \epsilon_k$ в виде десятичной дроби со всеми m верными знаками после запятой, т. е. $-10^{-m} \leq \epsilon_k < 10^{-m}$, а $y_k \cdot 10^m$ — целые числа ($k = \overline{1, N}$). Задача заключается в характеристике точек перегиба функции $f(x)$, т. е. точек экстремума производной $f'(x)$. Заменой переменного

$$g(x) = 10^m f \left[a + \frac{b-a}{N-1} (x-1) \right]$$

задача сводится к промежутку $[1, N]$. При этом $(k = \overline{1, N})$

$$g_k = g(k) = 10^m f(x_k) = z_k + c_k,$$

где $z_k = 10^m y_k$ — целые числа, $c_k = 10^m \varepsilon_k \left(-\frac{1}{2} \leq c_k < \frac{1}{2} \right)$.

Между точками перегиба функций f и g существует взаимно однозначное соответствие. Именно, если $\xi \in [1, N]$ — точка перегиба функции g , то $x = a + (b-a) (\xi-1) / (N-1)$ — точка перегиба функции f и наоборот. Тем самым задача сводится к нахождению точек перегиба для функции g . Пусть

$$\Delta^2 z_k = z_{k+2} - 2z_{k+1} + z_k, \quad (k = \overline{1, N-2}).$$

Можно показать, что: 1) если $\Delta^2 z_k \geq 2$ ($\Delta^2 z_k \leq -2$) для некоторого k ($1 \leq k \leq N-2$), то существует $\xi \in [k, k+2]$ ($\eta \in [k, k+2]$) такое, что $g''(\xi) > 0$ ($g''(\eta) < 0$);

2) если $\Delta^2 z_k = \Delta^2 z_{k+m} = 1$ ($\Delta^2 z_k = \Delta^2 z_{k+m} = -1$) для некоторых натуральных k и m , $k+m \leq N-2$, $\Delta^2 z_i = 0$ для всех натуральных $i \in (k, k+m)$, то существует $\xi \in [k, k+m+2]$ ($\eta \in [k, k+m+2]$) такое, что $g''(\xi) > 0$ ($g''(\eta) < 0$);

3) если $\Delta^2 z_k = -\Delta^2 z_{k+m} = 1$ ($\Delta^2 z_k = -\Delta^2 z_{k+m} = -1$) для некоторых натуральных k и m ($m \geq 2$, $k+m \leq N-2$), $\Delta^2 z_i = 0$ для всех натуральных $i \in (k, k+m)$, то:

а) существует функция $g^*(x)$, удовлетворяющая данной модели, для которой $(g^*(x))' \geq 0$ на всем интервале $[k, k+m+2]$;

б) существует функция $g_*(x)$, удовлетворяющая модели, для которой $(g_*(x))'' \leq 0$ на всем интервале $[k, k+m+2]$.

Рассмотренные выше три случая исчерпывают все возможные значения, принимаемые величиной $\Delta^2 z_k$.

Таким образом, анализ числовой последовательности $\Delta^2 z_k$ позволяет выявить промежутки, содержащие экстремумы функции $g'(x)$. Важно отметить, что получаемые интервалы исключают появление новых пиков независимо от выбора класса сглаживающей функции.

Далее путем замены f на конечные разности первых порядков Δf_k

$$\Delta f_k = \frac{f(x_{k+1}) - f(x_k)}{h},$$

где $h = x_{k+1} - x_k$ ($k = \overline{1, N-1}$), с последующим приближением ортогональными многочленами Чебышева [10] строится дифференциальная кривая функции $f(x)$.

Результаты и обсуждение. Предложенный метод дифференцирования был использован для получения дифференциальной кривой поли(d[A-T]).

На рис. 1 представлена ДКП, полученная при плавлении поли(d[A-T]) с шагом забора информации, равным 0,033 град, и при скорости нагрева образца 0,1 град/мин. Как видно из рисунка, наблюдаются незначительные по сравнению с основным пиком шумы, которыми практически можно пренебречь.

ДКП синтетического полимера представляет собой гладкую кривую, указывающую на то, что в динамически активной области кривой плавления искажений при дифференцировании не привносится. Отметим также, что при увеличении вдвое интервала забора данных (0,066 град) шумы в областях до и после завершения плавления полностью подавляются, не меняя общего профиля кривой (данные не приведены).

Нами также проведены опыты по плавлению образцов ДНК тимуса теленка. Как видно из рис. 2, выявляются шесть основных экстремумов на дифференциальной кривой, что находится в хорошем соответствии с данными по прямому дифференцированию [6], а также с результатами по микрокалориметрии, приведенными в работе [11]. От-

метим, что практически отсутствуют белые шумы, приносимые дифференцированием. Проведенные нами эксперименты показали, что хорошее разрешение на ДКП можно иметь вплоть до шага забора информации, равного 0,2 град в случае ДНК тимуса телят.

На основании наших исследований можно сделать вывод о том, что способы непрерывного и ступенчатого повышения температуры являются термодинамически эквивалентными, если, конечно, скорость нагрева достаточно низка. Так, при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,1 град/мин получаются воспроизводимые результаты, практически не отличающиеся от равновесных [12]. Преимущество непрерывного наращивания температуры проявляется в достижении высокой точности приращения значений, что невозможно при сту-

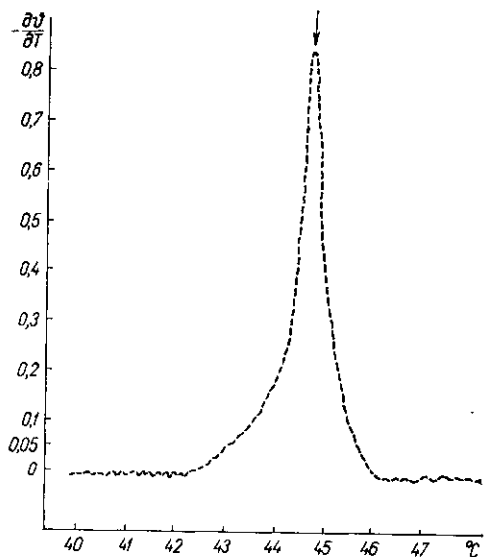


Рис. 1. Дифференциальная кривая плавления поли(d[A-T]) в 0,1XSSC и 0,1 мМ ЭДТА. Скорость нагрева — 0,1 град/мин, шаг забора информации 0,033 град
Fig. 1. Differential melting curve of poly(d[A-T]) in 0.1XSSC and 0.1 mM EDTA. Heating rate — 0.1 grad/min. Temperature slit width — 0.033 grad

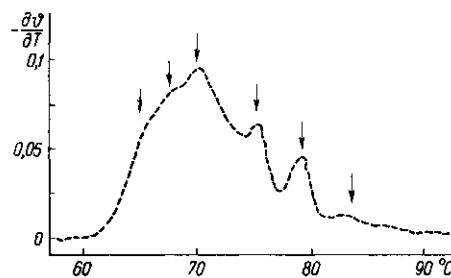


Рис. 2. Дифференциальная кривая плавления ДНК тимуса телят в 0,1XSSC и 0,1 мМ ЭДТА. Скорость нагрева — 0,1 град/мин, шаг забора информации 0,098 град
Fig. 2. Differential melting curve of calf thymus in 0.1 SSC and 0.1 mM EDTA. Heating rate — 0.1 grad/min. Temperature slit width — 0.098 grad

пенчатом. Это очень существенно, поскольку для количественного анализа профилей плавления нужно высокое разрешение и по температуре.

В заключение отметим, что предлагаемый метод позволяет выявить пики на дифференциальной кривой плавления непосредственно из математического анализа исходной кривой. В отличие от других имеющихся методов численного дифференцирования, предлагаемый в настоящей работе метод является не инструментом для идентификации пиков, а способом для их визуализации. Единственное условие для его использования — существование второй производной исходной кривой плавления.

DIFFERENTIAL MELTING CURVES OF DNA: RELIABILITY OF EXTREMA

*P. O. Vardevanyan, A. T. Karapetyan, G. A. Terzikyan,
R. R. Vardapetyan, E. A. Danielyan*

State University, Yerevan
* Teachers' Training Institute, Kirovakan

Summary

A method is suggested which permits revealing extrema on the differential melting curves which are strongly determined by experimental data. The only condition for the method is the existence of the second differential of the initial integral melting curve.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лазуркин Ю. С. Молекулярное плавление ДНК и эффект тонкой структуры кривых плавления // Молекуляр. биология.— 1977.— 11, № 6.— С. 1311—1324.
2. Fine structure of DNA melting curves / Yu. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Vologodskii et al. // Biopolymers.— 1976.— 15, N 6.— P. 1019—1036.
3. Wada A., Yabuki S., Husimi Y. Fine structure in the thermal denaturation of DNA: high temperature resolution spectrophotometric studies // Crit. Rev. Biochem.— 1980.— 9, N 2.— P. 87—144.
4. Wartell R. M., Benight A. S. Thermal denaturation of DNA molecules: a comparison of theory with experiment // Phys. Repts.— 1985.— 126, N 2.— P. 67—107.
5. Vitek A., Reddy C. R., Pivec L. Numerical analysis of absorption curves of a multiphase shape by a computer // Biochim. et biophys. acta.— 1974.— 353, N 3.— P. 385—391.
6. Blake R. D., Lejoley S. G. Spectral analysis of high resolution direct-derivative melting curves of DNA for instantaneous and base composition // Ibid.— 1978.— 518, N 2.— P. 233—246.
7. Pavlov V. M., Lyubchenko Yu. L. A new method for recording of DNA differential melting curves // Biopolymers.— 1978.— 17, N 4.— P. 795—798.
8. High-resolution thermal denaturation of DNA. 1. Theoretical and practical considerations for the resolution of thermal subtransition / A. T. Ansevin, D. L. Vizard, B. W. Brown, J. McConathy // Ibid.— 1976.— 15, N 1.— P. 153—174.
9. Gabarro J. Numerical analysis of thermal denaturation of nucleic acids // Analyt. Biochem.— 1978.— 91, N 2.— P. 309—322.
10. Волков Е. А. Численные методы.— М.: Наука, 1982.— 254 с.
11. Gruenwedel D. W. Salt effects on the denaturation of DNA // Biochim. et biophys. acta.— 1974.— 340, N 1.— P. 16—30.
12. Карапетян А. Т., Вардеванян П. О., Франк-Каменецкий М. Д. Влияние концентрации ионов Na^+ на теплоту перехода спираль—клубок // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 5.— С. 31—37.

Ереван, гос. ун-т
Кировакан. гос. пед. ин-т

Получено 29.09.89

УДК 578.841:577.113:578.23

© Н. Ю. Мирюта, Л. И. Строковская, И. Н. Скуратовская, 1990

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОБЛАСТЕЙ ИНТЕГРАЦИИ ДНК ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА И ДНК КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА В ГЕНОМЕ БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ МОЛИ

Исследованы некоторые структурные характеристики мест связывания клеточных и вирусных последовательностей в ДНК большой воцинной моли (БВМ) пражской линии и в геноме вируса ядерного полиэдрога (ВЯП) БВМ. Показана возможность ковалентной связи генома вируса с геномом БВМ. Исследование кинетических и термических фракций ДНК БВМ пражской линии с различными молекулярными массами методами молекулярной гибридизации позволило локализовать области, содержащие участки гомологии вирусной и клеточной ДНК в вирусном геноме и исследовать области вирусной ДНК, прилегающие к клеточной. На основании проведенных исследований предложена модель интеграции геномов ВЯП БВМ и БВМ пражской линии.

Введение. Вирусоносительство широко распространено у чешуекрылых насекомых и проявляется под влиянием физических, химических и биологических факторов. Различные популяции большой воцинной моли (БВМ) отличаются по способности к активации в них латентного вируса ядерного полиэдрога (ВЯП) БВМ. У БВМ пражской линии, например, не наблюдается ни спонтанный, ни индуцированный ядерный полиэдроз. Предполагалось, что у нее нет латентного вируса. Предположение о носительстве вирусных геномов этими насекомыми возникло, в частности, для объяснения результатов экспериментов по заражению насекомых БВМ пражской линии чужеродными ВЯП. При этом через несколько пассажей образовывались полиэдры, по форме характерные для ВЯП БВМ [1]. Продолжая начатые исследования [2], в этой работе мы изучали физическое состояние вирусного генома в клет-