



УДК 5 77.2:577.32

**КОМПАКТИЗАЦИЯ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ СУПЕРСПИРАЛЬНОЙ ДНК, АДСОРБИРОВАННЫХ НА АМИНОСЛЮДЕ**

© 2006 г. Л. А. Лиманская\*, А. П. Лиманский\*,\*\*#

\*Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, 61057, Харьков, ул. Пушкинская, 14/16, Украина;

\*\*Лаборатория ядерных и сигнальных механизмов, Институт биоисследований, университет Киото, Япония  
Поступила в редакцию 16.12.2005 г. Принята к печати 24.03.2006 г.

Предложена модель возможных конформационных переходов суперспиральной ДНК *in vitro* в отсутствие белков при возрастании уровня компактизации. Суперспиральная ДНК pGEMEX длиной 3993 п.о., иммобилизованная на различных субстратах (свежесколотой слюде, стандартной аминокислоте, модифицированной аминокислоте с повышенной гидрофобностью по сравнению со стандартной аминокислотой), была визуализирована с помощью атомно-силовой микроскопии в воздухе. На модифицированной аминокислоте, характеризующейся повышенной плотностью поверхностного положительного заряда, наряду с плектонемичными молекулами ДНК, были визуализированы единичные молекулы с чрезвычайно высоким уровнем компактизации. При повышении уровня суперспирализации ДНК длина оси суперспирали первого порядка молекул уменьшается от 570 до 370 нм с последующим образованием оси суперспирали второго и третьего порядка длиной около 280 и 140 нм соответственно. Компактизация молекул завершается образованием мини-тороидов диаметром около 50 нм и молекул сферической формы. Показано, что компактизация иммобилизованных на аминокислоте единичных суперспиральных молекул ДНК до уровня мини-тороидов и сфероидов обусловлена экранированием взаимно отталкивающихся отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК положительно заряженными аминогруппами аминокислоты, имеющей высокую плотность поверхностного заряда.

*Ключевые слова:* суперспиральная ДНК; атомно-силовая микроскопия; АСМ; аминокислота; ДНК, компактизация; тороид.

**ВВЕДЕНИЕ**

Геномная ДНК огромной длины (от миллиметра до метра) в нуклеоидах бактерий и ядрах эукариот, объем которых составляет всего лишь от нескольких единиц до сотен кубических микрометров, компактизована посредством взаимодействия с белками и другими соединениями в более высокоупорядоченные структуры [1]. В свою очередь, объем нуклеотида, например *E. coli*, составляет лишь около четверти объема клетки. В отсутствие белков молекула ДНК, компактизованная случайным образом, занимает значительно больший объем, чем в ядре или нуклеоиде бактериальной клетки. Согласно современным воззрениям, компактизация ДНК в клетках эукариот обусловлена ее взаимодействием с рядом белков, в первую очередь с топоизомеразами и гистонами, с последующим образованием нуклеосом, хроматиновых волокон и хромосом [2–4]. При

этом *in vivo* гистоны нейтрализуют 57% отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК [5], а оставшуюся часть ее заряда нейтрализуют другие положительно заряженные ионы клеточного окружения, в том числе моно- и мультивалентные катионы, которые составляют до 1% массы клетки [6].

Для прокариот известно около 10 белков, подобных гистонам, которые участвуют в компактизации ДНК, в частности, ДНК-связывающие белки HU (heat unstable), H-NS (histone-like nucleoid structuring), не проявляющие специфичности к нуклеотидной последовательности ДНК [7]. Другие белки, характеризующиеся специфичностью к последовательности при связывании с ДНК, – это белок IHF (integration host factor), белки группы HMG (high mobility group), которые модулируют связывание гистонов с ДНК. Кроме того, были идентифицированы конденсины и когезины, относящиеся к белкам группы SMC (structural maintenance of chromosome), которые играют центральную роль в конденсации хромосом и приводят к непосредственной конденсации ДНК [8].

Для исследования структурной организации генома в ядре эукариот используют разные модельные системы. Посредством атомно-силовой

Сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия; АРТЕS – 3-аминопропилтриэтоксисилан; ссДНК и сссДНК – суперспиральная и сверхсуперспиральная ДНК.

# Автор для связи (тел.: (38)-057 7001-708; факс: (38)-057 7003-410; эл. почта: o.lymunskiy@mail.ru).

микроскопии (АСМ) было обнаружено, что нуклеоид *E. coli* обладает структурой, изменяющейся на протяжении клеточного роста: его организация в стационарной фазе более компактизована, чем в логарифмической фазе. Однако в обеих фазах, и стационарной, и логарифмической, нуклеоид образован волокнами диаметром 80 нм [1]. В дополнение к 80-нм волокну, в логарифмической фазе нуклеоида также были визуализированы более тонкое волокно диаметром 40 нм и высокоупорядоченная петля.

Широкое распространение получила и другая модельная система – нуклеосома, которая является основной повторяющейся единицей хроматина. В этом случае для линейной ДНК в комплексе с гистоновым октамером, который образован двумя молекулами каждого из белков H2A, H2B, H3 и H4, были визуализированы структуры типа “шарики на нити” [9]. Компактизация и конденсация ДНК с образованием тороидов и волокон (жгутов) может быть также достигнута и при других условиях, помимо комплексообразования с белками [10, 11]. Многочисленными исследованиями было показано, что поликатионы (полилизин, протамин, гексамин кобальта), природные (спермин<sup>4+</sup>, спермидин<sup>3+</sup>) и синтетические полиамины (диаминопропан<sup>2+</sup>) приводят к конденсации ДНК и образованию тороидов [12–15]. Более того, в работе [16] было продемонстрировано, что для конденсации ДНК присутствие белков или водорастворимых мультивалентных катионов не является обязательным условием. Конденсация ДНК с последующей АСМ-визуализацией может быть достигнута также посредством иммобилизации ее молекул на положительно заряженной поверхности аминокислоты (в отличие от варианта использования свежесколотой слюды в присутствии катионов металлов в силу ограничений, присущих данному методу). При этом степень конденсации молекул ДНК можно варьировать, применяя различные производные аминокислот, используемые для модификации слюды, а также путем изменения концентрации NaCl при иммобилизации ДНК [16, 17]. Однако в данных работах при использованном узком интервале изменения концентрации NaCl (10–100 мМ) не были визуализированы иные, кроме тороидов, высококомпактизованные структуры ДНК. Интересно отметить, что в работах [18, 19] в условиях конденсации линейных молекул ДНК формировались мультимолекулярные агрегаты, а не конденсированные структуры, образованные единичными молекулами ДНК.

Таким образом, компактизация ДНК до уровня наночастиц является фундаментальным биологическим явлением, играющим существенную роль при упаковке ДНК в вирусах, нуклеоидах прокариот, ядрах эукариот, а также при разработке невирусных систем для транспортировки

генетической информации в клетки эукариот *in vitro* и *in vivo* (посредством использования катионных липосом и полипептидов для конденсации ДНК) [16].

В данной работе мы получили изображения единичных молекул суперспиральной ДНК (ссДНК), уровень компактизации которых значительно превосходит ранее достигнутый. Использование нового полученного нами ранее субстрата для иммобилизации ДНК – модифицированной аминокислоты с повышенной плотностью поверхностного положительного заряда и повышенной гидрофобностью [20] по сравнению со стандартной аминокислотой – позволило визуализировать последовательные стадии компактизации единичных кольцевых молекул ДНК. Обнаружены компактизованные структуры, образованные как путем уменьшения длины суперспиральной оси молекул в два и четыре раза с формированием жгутов и образованием оси суперспирали второго и третьего порядка соответственно, так и путем последующей сборки единичных молекул ссДНК в мини-тороиды, полусфероиды и сфероиды с образованием сверхсуперспиральных структур (сссДНК).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поверхность слюды, стандартного субстрата для АСМ, отрицательно заряжена в буферных растворах при нейтральных значениях pH [21]. Поэтому для иммобилизации отрицательно заряженных молекул ДНК на поверхности слюды используют несколько подходов, позволяющих изменить суммарный отрицательный поверхностный заряд слюды на положительный [9, 22, 23]. Отметим, что поверхность свежесколотой (т.е. немодифицированной) слюды обладает гидрофильными свойствами, что выражается в том, что капля раствора ДНК растекается по ней. В то же время аминокислота, получаемая модификацией слюды аминокислотами [23] и несущая на своей поверхности положительно заряженные аминокислотные группы, обладает ярко выраженными гидрофобными свойствами, что визуально проявляется в том, что капля раствора ДНК не растекается по поверхности, а принимает форму, близкую к шару [20]. Модификация слюды аминокислотами возможна как в растворе (при этом на поверхности аминокислоты образуются самоассоциированные монослои молекул аминокислоты) [24, 25], так и в газовой фазе [22]. Если в первом варианте адсорбированные молекулы ДНК находятся на расстоянии ~1 нм от поверхности слюды (в случае использования 3-аминопропилтриэтоксисилана, АРТЕС) [24], то для второго варианта, используемого в данной работе, определить это расстояние гораздо сложнее, поскольку структура поверхностного слоя аминокислоты исследована только косвенно

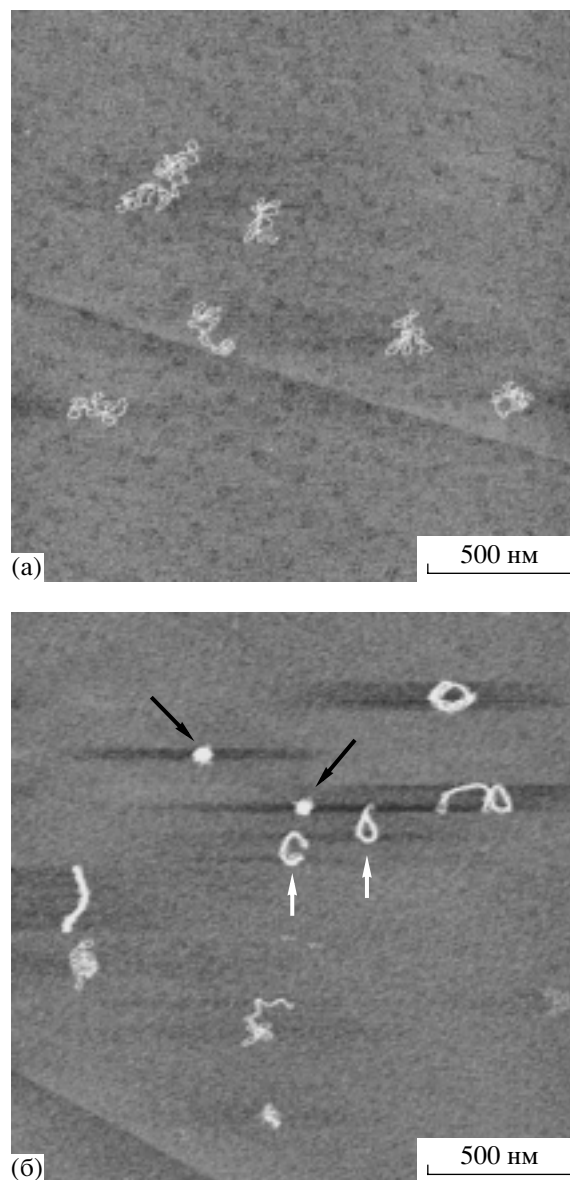
ми методами. Так, например, анализ АСМ-изображений, компактизованных на аминослюде, полученной в газовой фазе, таких структур, как сфероид и димер, показывает, что молекулы ссДНК как бы погружены в поверхностные слои аminosилана. Рядом с этими структурами с повышенной плотностью всегда присутствуют участки аминослюды, высота слоя аminosилана которых существенно меньше, чем его высота в отсутствие сфероидов или димеров [26, 27].

Локализация молекул ДНК, иммобилизованных на поверхности аминослюды и свежесколотой слюды (в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ ), принципиально различается: в первом случае молекулы ДНК находятся на гораздо большем расстоянии от поверхности слюды, чем при адсорбции на слюде, покрытой ионами магния. Кроме того, “погружение” молекулы ДНК в слой аminosилана на поверхности слюды обеспечивает за счет объемного взаимодействия не только более значительный (по сравнению с линейным взаимодействием для свежесколотой слюды в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ ) уровень экранирования заряда отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК положительно заряженными аминогруппами, экспонированными на поверхности аминослюды, но и динамическую подвижность молекул ДНК.

Используемые в данной работе субстраты для иммобилизации ДНК можно расположить в порядке возрастания гидрофобности следующим образом:

**свежесколотая слюда < стандартная аминослюда < модифицированная аминослюда.**

Иммобилизация суперспиральных ДНК на модифицированной аминослюде, имеющей повышенную плотность поверхностного положительного заряда [26, 27] по сравнению не только со свежесколотой слюдой, но и со стандартной аминослюдой [26, 27], приводит к существенной компактизации молекул ДНК (рис. 1). Из исследованных 108 индивидуальных молекул ссДНК наиболее характерные варианты для 98 визуализированных нами единичных ссДНК с соответствующими параметрами представлены в таблице (остальные 10 молекул представляют промежуточные варианты показанных конденсированных молекул). Из них количество плектонемичных ссДНК (А2) с низкой плотностью супервитков  $\sigma \sim -0.024$  с оставляет 21%; ссДНК с высоким значением  $\sigma \sim -0.13$ , образующие суперспиральную ось первого порядка (В3), – 12%; ссДНК, образующие ось суперспирали второго порядка (С3, В2, С2), – 27%; молекулы, образующие суперспиральную ось третьего порядка (D2, D3, E2), – 14%; наиболее высококомпактизованные молекулы – сфероиды – 17%.



**Рис. 1.** Изображение суперспиральной ДНК pGEMEX в воздухе, полученное с помощью атомно-силового микроскопа после нанесения раствора ДНК в ТЕ-буфере на поверхность **стандартной аминослюды (а)** и **модифицированной аминослюды (б)**. Представлены суперспиральные молекулы ДНК с различным уровнем компактизации: от плектонемичных (а) до сверхсуперспиральных молекул (б) с различной длиной суперспиральной оси (две молекулы в тороидальной и приближенной к тороидальной конформации показаны белыми вертикальными стрелками), а также в конформации сфероида (два сфероида показаны наклонными черными стрелками). Размер кадра для обоих изображений 2 мкм × 2 мкм.

Физико-химические свойства аминослюды, получаемой модификацией в парах производных аminosиланов и используемой в качестве субстрата для АСМ, недостаточно изучены. Существуют только приблизительные оценки поверх-

Параметры суперспиральных молекул ДНК рGEMEX (контурная длина, объем и др.), определенные из АСМ-изображений. Значение исключенного объема для ДНК рGEMEX (3993 п.о.) составило  $V = 4010 \text{ нм}^3$

Вариант на рис. 6*	Молекула(ы)	Максимальная высота $h_{\text{max}}$ , нм	Минимальная высота $h_{\text{min}}$ , нм	Контурная длина суперспиральной молекулы $l$ , нм	Длина суперспиральной оси $l$ , нм	Объем молекулы $V$ , нм <sup>3</sup>
A3 <sup>Г</sup> (3)		0.80	0.35**	1243	466 <sup>а</sup>	3510
A2 <sup>А</sup> (21)		0.99	0.35**	1216	—	3530
B3 (12)		0.95	0.35**	567	567 <sup>а</sup>	4440
C3 (16)		1.69	0.78	279	279 <sup>б</sup>	3280
B2 (4)		1.35	0.28**	260	260 <sup>б</sup>	3470
C2 (7)		1.36	0.30**	270	270 <sup>б</sup>	3520
D2 (3)		3.00	1.25	140	140 <sup>в</sup>	5180
D3 (7)		1.74	0.84	260	260	3980
E2 (4)		2.60	1.85	—	—	3620
E3 (17)		3.45	0.30**	—	—	3140
B1 (1)		1.40	0.35**	548	548	6300

ностной плотности аминогрупп. Так, например, для стандартной аминокислоты было установлено [28], что только 50% аминогрупп, экспонированных на поверхности, активны, т.е. протонированы (для модифицированной аминокислоты мы не располагаем такого рода данными). В то же время на основании измерения периода полуактивности (времени, в течение которого количество иммобилизованных молекул ДНК уменьшается в два раза) стандартной и модифицированной аминокислоты (посредством вычисления количества иммобилизованных молекул ДНК на определенной площади аминокислоты после хранения аминокислоты в атмосфере аргона) [26] мы предполагаем, что практически все аминогруппы модифицированной аминокислоты являются протонированными.

Несмотря на многочисленные экспериментальные исследования взаимодействия ДНК с мультивалентными катионами, теоретические аспекты данного явления изучены недостаточно. Даже небольшие полиамины не могут быть представлены в виде простых точечных ионов, как это предполагается в таких классических полиэлектролитных теориях, как теория конденсации Мэнинга [29] и теория Пуассона–Больцмана [30]. Согласно теории конденсации Мэнинга, предсказывающей непосредственную связь между нейтрализацией заряда ДНК и концентрацией моно- и мультивалентных ионов, которой отдавали предпочтение в 70–80-е годы прошлого века, для компактизации молекул ДНК около 90% отрицательного заряда фосфатных групп должно быть нейтрализовано [15]. В то же время экспериментальные данные, полученные с помощью интегральных методов (например, калориметрического анализа), показывали, что конденсация ДНК происходит при различном уровне нейтрализации заряда фосфатных групп ДНК – 67% для гексамина кобальта и 87% для спермидина [31]. Кроме того, в работе [32] было показано, что теоретический подход Мэнинга является довольно грубым приближением теории Пуассона–Больцмана. Поэтому М. Франк-Каменецким было предложено пересмотреть выводы теории Мэнинга или принимать их с осторожностью [32].

Рассматривая ДНК как бесконечно длинный отрицательно заряженный цилиндр (с точки зрения максимально упрощенной модели теории полиэлектролитов), в работе [33] определили, что один отрицательный заряд расположен на площади  $1.07 \text{ нм}^2$ . В то же время катион додециламмония может занимать площадь  $0.90 \text{ нм}^2$ , что, по мнению авторов, указывало на принципиальную возможность полной нейтрализации заряда ДНК при взаимодействии ДНК–катион.

Проведенные в последние годы расчеты взаимодействия ДНК с противоионами методами молекулярной динамики позволили получить до-

вольно неожиданные результаты. Так, в работе [34] были обнаружены принципиальные различия при взаимодействии ДНК с природными (спермидин<sup>3+</sup>, спермин<sup>4+</sup>) и синтетическими (диаминопропан<sup>2+</sup>) полиаминами. Во-первых, было показано, что связывание катионов  $\text{NH}_3^+$  или  $\text{Na}^+$  с одним сайтом на ДНК практически исключает связывание другого катиона с соседним сайтом, расположенным на расстоянии ближе, чем  $0.8 \text{ нм}$ , за счет электростатического отталкивания. Другими словами, сайты связывания для исследуемых поликатионов локализованы вдоль двухнитевой ДНК на расстоянии  $0.4 \text{ нм}$  друг от друга, в то время как в работе [33] было оценено, что соседние сайты связывания катионов разделены расстоянием  $0.17 \text{ нм}$  вдоль ДНК. Во-вторых, продемонстрировано, что, в отличие от природных полиаминов, синтетический поликатион диаминопропан может образовывать мостики, соединяющие соседние фосфатные группы вдоль цепи ДНК.

Нами проведена оценка плотности аминогрупп на поверхности кремния, которую в первом приближении можно считать подобной поверхности слюды после обработки АРТЕС. В первом варианте, при котором одна молекула АРТЕС взаимодействует с тремя ОН-группами, экспонированными на поверхности кремния (согласно предложенной модели поверхности, обработанной АРТЕС [35]), одна аминогруппа локализована на площади  $12.90 \text{ нм}^2$ . В то же время для поверхности нитрида кремния (материал, из которого производят АСМ-зонды [36]) было определено экспериментально, что на площади  $1 \times 10^6 \text{ нм}^2$  после модификации с помощью АРТЕС в газовой фазе содержится  $1730 \pm 200$  а аминогрупп [35], что соответствует локализации одной аминогруппы на площади  $6 \times 10^2 \text{ нм}^2$ . Во втором варианте, в предположении, что одна молекула АРТЕС взаимодействует с одной ОН-группой окисленной поверхности кремния, мы определили, что одна  $\text{NH}_2$ -группа локализована на площади  $3.87 \text{ нм}^2$ . Эти данные по порядку величины совпадают с выводами работы [34], из которой мы определили, что сайт связывания для катиона на ДНК локализован на площади  $2.51 \text{ нм}^2$ . В этом случае, при удалении сайтов связывания для катионов на расстояние  $0.4 \text{ нм}$  вдоль нити ДНК, 42% отрицательного заряда фосфатных групп будет нейтрализовано при взаимодействии с поликатионами для случая занятости всех мест связывания поликатионами на ДНК.

Таким образом, эти данные показывают, что взаимодействие ДНК с поверхностью модифицированной аминокислоты качественно подобно взаимодействию ДНК–полиамин, при котором молекулы ДНК взаимодействуют с положительно заряженной матрицей, степень гидрофобности которой варьирует в зависимости от особенно-

стей проведения процедуры модификации слюды в газовой фазе.

Отметим также, что поверхностные свойства аминослюды определяются целым набором факторов. Так, например, эмпирически установлено, что стандартная аминослюда, которую используют в качестве АСМ-субстрата для визуализации ДНК, может быть получена обработкой в парах только дистиллированного АРТЕS в атмосфере инертного газа. Использование неперегнанного АРТЕS (подверженного гидролизу в атмосфере воздуха) приводит к получению аминослюды с низкой плотностью поверхностного заряда, непригодной для получения качественных изображений ДНК [20].

Поверхностные свойства аминослюды (эластичность, заряд) могут быть охарактеризованы с помощью различных методов, включая рентгеновскую спектроскопию и АСМ в режиме силовых измерений, посредством определения количества протонированных аминокрупп и силы адгезии соответственно. Ранее с помощью АСМ в режиме силовых измерений для стандартной аминослюды нами была определена сила адгезии (т.е. сила, необходимая для того, чтобы разъединить соприкоснувшиеся в процессе сближения и находящиеся в контакте поверхности аминослюды и зонда), величина которой составила  $F \sim 2\text{--}4.6$  нН в ТЕ-буфере для различных зондов [36]. С другой стороны, поскольку аминослуду используют в качестве субстрата для визуализации линейных и ссДНК, было установлено, что топология именно ссДНК, иммобилизованной на аминослуде, является наиболее чувствительным своеобразным показателем “качества” поверхности аминослюды.

Единичные молекулы ссДНК, образующие ось суперспирали второго порядка, показаны на рис. 2а. Длина суперспиральной оси этих высококомпактизованных молекул по сравнению с плектонемичными ДНК уменьшилась до значения, составляющего около одной пятой контурной длины релаксированной молекулы ( $l = 260$  нм).

Еще один из вариантов высококомпактизованной молекулы ссДНК, образующейся на поверхности модифицированной аминослюды, – сфероид (рис. 2а). Для более точного вычисления объема, как правило, мы использовали продольное сечение молекулы секущей плоскостью, перпендикулярной плоскости слюды, а не измеренное в одной точке значение высоты молекулы (которое существенно варьирует) для ссДНК: при характерной высоте двойной спирали ДНК, иммобилизованной на слуде, равной 0.3–0.4 нм, высота в узлах, образованных двумя перекрученными нитями ДНК, может достигать 1.3–1.8 нм.

На основе расчета объема конденсированной структуры непосредственно из АСМ-изображения можно определить количество компактизо-

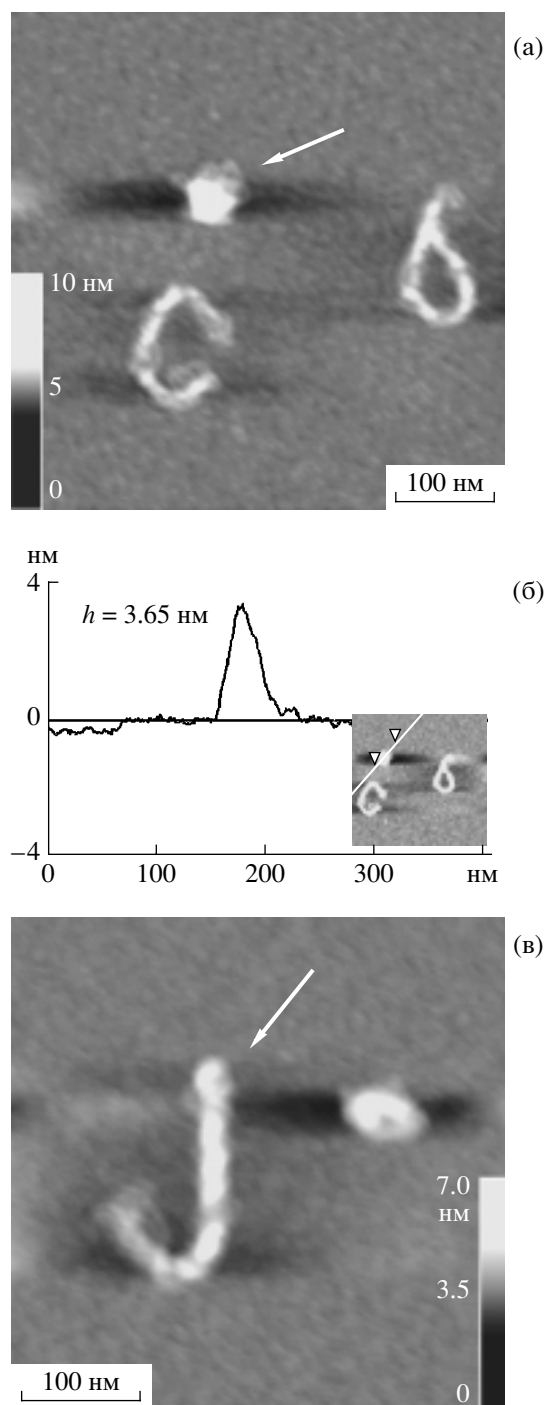
ванных суперспиральных молекул ДНК, участвующих в формировании того или иного агрегата. Значение объема ДНК может быть легко вычислено посредством умножения диаметра ДНК на площадь поперечного сечения молекулы в предположении В-формы ДНК (т.е. расстояния между основаниями вдоль оси двойной спирали  $h = 0.34$  нм). Например, объем сфероида  $V$ , рассчитанный исходя из площади сечения и диаметра, приведенного на рис. 2а, составляет 3140 нм<sup>3</sup>. Поскольку исключенный объем ДНК рGEMEX в предположении В-формы составляет  $V_{\text{искл.}} = 4010$  нм<sup>3</sup>, приведенные результаты свидетельствуют о том, что сфероид образован единичной молекулой ссДНК.

В результате дальнейшей компактизации образуются молекулы с еще вдвое меньшей длиной суперспиральной оси (длина оси третьего порядка составляет  $l = 140$  нм, вариант D2, таблица), а также молекулы в сферической конформации – полусфероиды (вариант E2, таблица) и сфероиды (E3, таблица).

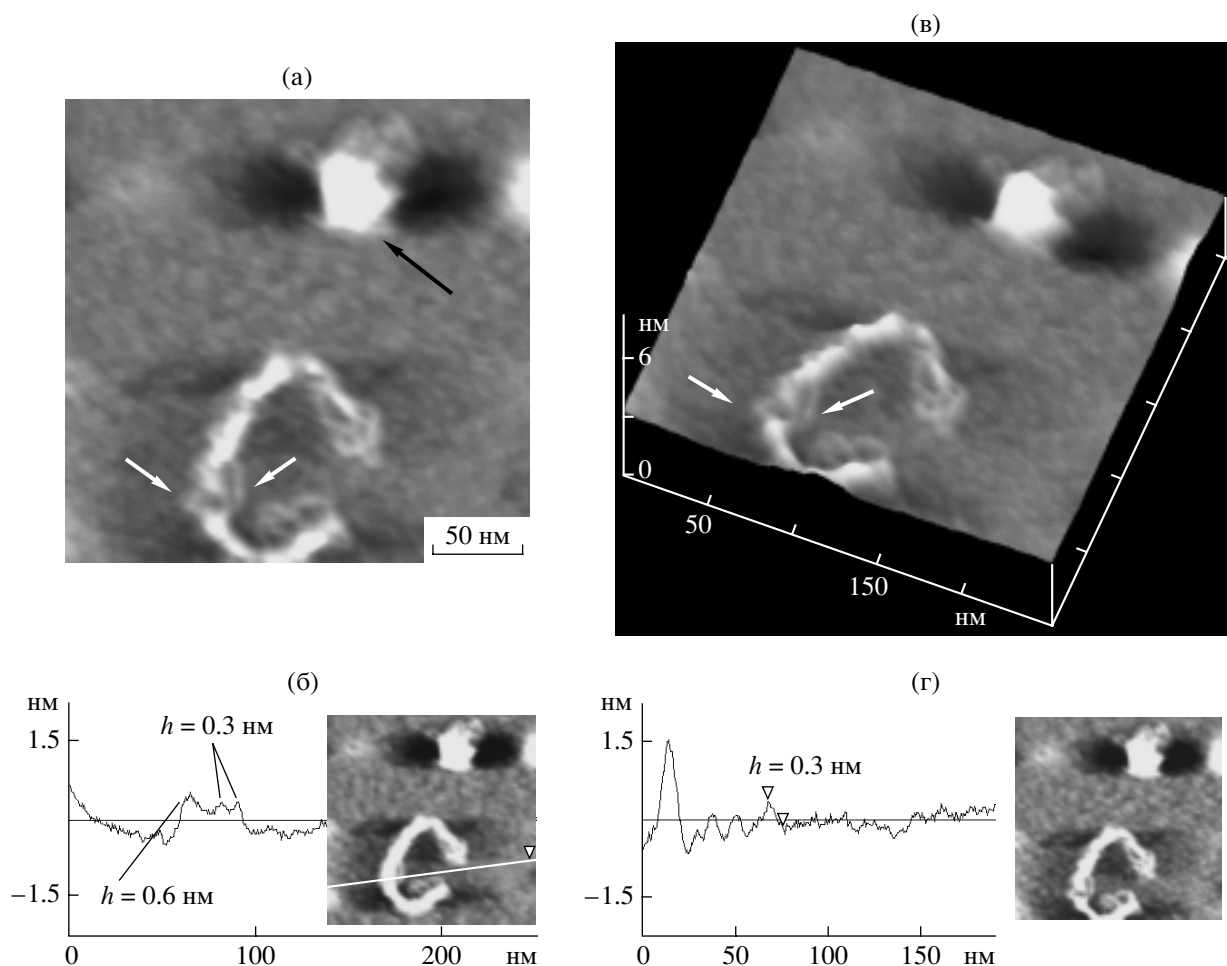
Компактизация на модифицированной аминослуде происходит не только для единичных молекул ДНК. На рис. 2б приведено изображение димера ( $V 7080$  нм<sup>3</sup>) – компактизованной структуры, образованной двумя молекулами ДНК, длина суперспиральной оси которого составляет 260 нм, как и длина суперспиральной оси единичной молекулы (рис. 2а).

*Компактизованные молекулы образованы не только димерами, но и единичными молекулами ДНК*

Поскольку ранее конденсация ДНК под воздействием различных факторов, в том числе и белков [10, 11], была продемонстрирована только для димеров и тримеров, но не для единичных молекул ДНК, рассмотрим более детально С-образную сверхсуперспиральную молекулу ДНК, изображенную на рис. 2а, которая находится в конформации, приближенной к тороидальной. АСМ-изображение этой молекулы с более высоким разрешением (рис. 3а) и ее трехмерное изображение (рис. 3б) отчетливо демонстрируют, что данная ссДНК образована несколькими четко различимыми нитями (стрелками на рис. 3а указана часть молекулы, образованная тремя локально разошедшимися нитями). Профиль сечения (рис. 3б), проведенного через эти нити (на вставке показана линия, вдоль которой проведена секущая плоскость перпендикулярно плоскости рисунка), позволяет определить высоту этих нитей. Необходимо отметить, что измерение высоты биополимера, иммобилизованного на субстрате, с субнанометровым разрешением (!) является крайне важной особенностью атомно-силовой микроскопии, выгодно отличающей ее и в этом отношении от электронной микроскопии. По-



**Рис. 2.** АСМ-изображение единичных сверхспиральных молекул ДНК рGEMEX, их димеров и сфероидов на модифицированной аминокислоте. (а) Длина суперспиральной оси второго порядка каждой из молекул ДНК составляет 260–270 нм, т.е. около четверти контурной длины релаксированной молекулы. Стрелкой показан сфероид. Приведена шкала градаций серого, соответствующая диапазону  $Z$ -координаты от 0 до 10 нм, которая позволяет оценить высоту иммобилизованной молекулы. Размер кадра 500 нм  $\times$  500 нм. (б) Профиль сечения молекулы ДНК в сферической конформации, позволяющий определить высоту молекулы. Максимальная высота сфероида  $h_{\max} = 3.65$  нм. На вставке показана линия, вдоль которой было выполнено сечение. (в) АСМ-изображение димера, образованного двумя сверхспиральными молекулами ДНК (показан стрелкой), длина суперспиральной оси которого составляет 260 нм, а объем равен удвоенному объему единичной суперспиральной молекулы ДНК. Размер кадра 500 нм  $\times$  500 нм. Шкала градаций серого соответствует диапазону  $Z$ -координаты от 0 до 7 нм. Рядом с димером адсорбирован полусфероид, образованный единичной молекулой ДНК.



**Рис. 3.** АСМ-изображение (а), профили сечения (б) и (г) и трехмерное изображение (в) единичной сверхсперспиральной ДНК рGEMEX, образовавшей ось суперспирали 2-го порядка. (а) Стрелками показаны разошедшиеся нити ДНК, профиль сечения которых приведен на рис. 4б. Черная стрелка указывает на сфероид. (б) Линия, вдоль которой проведена секущая плоскость через три разошедшиеся нити, показана на вставке. Высота двух пиков составляет 0.3 нм, а высота третьего пика – 0.6 нм. (г) Профиль сечения, проведенного через разошедшиеся нити сверхсперспиральной ДНК; секущая плоскость проведена вдоль линии, показанной на вставке. Высота этих нитей составляет 0.3 нм, что соответствует высоте нити двухцепочечной ДНК. Размер кадра 250 нм × 250 нм.

сколько высота двух нитей ДНК составляет 0.3 нм, а высота третьей нити равна 0.6 нм, то это означает, что две разошедшиеся нити сссДНК представляют двухцепочечные ДНК, а нить, высота которой равна удвоенной высоте молекулы ДНК на слуде ( $h$  0.6 нм), образована двумя закрученными двухцепочечными нитями.

Таким образом, анализ этого профиля сечения показал, что С-образная сссДНК образована четырьмя двухцепочечными нитями ДНК. Поскольку контурная длина приведенной сссДНК составляет 260 нм, это означает, что данная компактизованная структура образована единичной кольцевой молекулой ДНК, “сложенной пополам”. Заметим, что при контурной длине  $l$  260 нм число нитей ДНК в профиле сечения для димера должно было быть равно восьми.

Представленный на рис. 3г другой профиль сечения этой С-образной молекулы подтверждает, что она образована нитями, высота которых равна высоте двунитевой ДНК ( $h$  0.3 нм). Фактически, анализ профиля сечения наряду с определением исключенного объема молекулы также позволяет дифференцировать мономерные структуры от агрегатов, образованных несколькими молекулами. Внимательный анализ АСМ-изображений сссДНК (например, рис. 3а и 3г) показывает, что высота двух перекрученных нитей ДНК, образующих сссДНК, равна удвоенной высоте нити двухцепочечной ДНК ( $h$  0.3 нм) только при условии, если нити закручены друг относительно друга и плотно прилегают одна к другой. В противном случае, когда нити завиты одна относительно другой, но не прилегают плотно друг к другу, высота молекулы может достигать 1.3–1.8 нм.



Другой визуализированной нами структурой, внешне похожей на сфероид на АСМ-изображении с невысоким разрешением, является мини-тороид. На рис. 4 показан мини-тороид, образованный единичной ссДНК, профили сечений и трехмерное изображение молекулы. Значение объема данной молекулы составляет  $3980 \text{ нм}^3$ , что соответствует объему единичной молекулы ДНК рGEMEX. Из профилей сечений на рис. 4б и 4в можно увидеть, что три из четырех сегментов тороида имеют одинаковую высоту ( $h = 1.74 \text{ нм}$ ), а четвертый сегмент имеет почти вдвое меньшую высоту ( $0.84 \text{ нм}$ ). Это означает, что в четвертом сегменте число оборотов жгута ссДНК меньше, чем в других трех сегментах, т.е. мини-тороид представляет собой своеобразное мини-кольцо с разрезом в верхней части, длина которого составляет четверть длины окружности.

Параметры преобладающего большинства визуализированных компактизованных ссДНК представлены в таблице. Ранее в работах [12, 16, 19, 37] было показано, что в образовании тороидов участвуют несколько линейных или кольцевых молекул ДНК. Нами также были визуализированы тороиды, образованные двумя ссДНК. Во всех позициях таблицы, кроме димерного жгута варианта Е1, приведены характеристики АСМ-изображений единичных молекул ДНК.

*Компактизация сверхсуперспиральных молекул ДНК происходит с образованием осей суперспирали второго и третьего порядка*

Ранее было установлено, что длина оси суперспиральной ДНК остается постоянной в диапазоне плотности супервитков  $0.03 < |\sigma| < 0.12$ , и ее значение составляет примерно 35% контурной длины релаксированной молекулы [38]. Это условие выполняется для молекул суперспиральной ДНК рGEMEX, адсорбированных на свежесколотой слюде, которая имеет сравнительно невысокую плотность поверхностного заряда. В этом случае (рис. 5а) длина оси суперспирали равна  $466 \pm 5 \text{ нм}$  (что составляет 35% от контурной длины ДНК в предположении В-формы), значение плотности супервитков  $\sigma = -0.024$ , а количество узлов  $n = 7-8$ . При иммобилизации ссДНК на поверхность модифицированной аминослюды были визуализированы молекулы как с гораздо более высоким значением плотности супервитков, так и с различной длиной оси суперспирали (рис. 5б–5г). Длина оси суперспирали молекулы, изображенной на рис. 5б, составляет  $567 \pm 18 \text{ нм}$ , но количество узлов значительно возросло ( $n = 19$ ) и, как следствие, значение плотности супервитков составляет  $\sigma = -0.13$ .

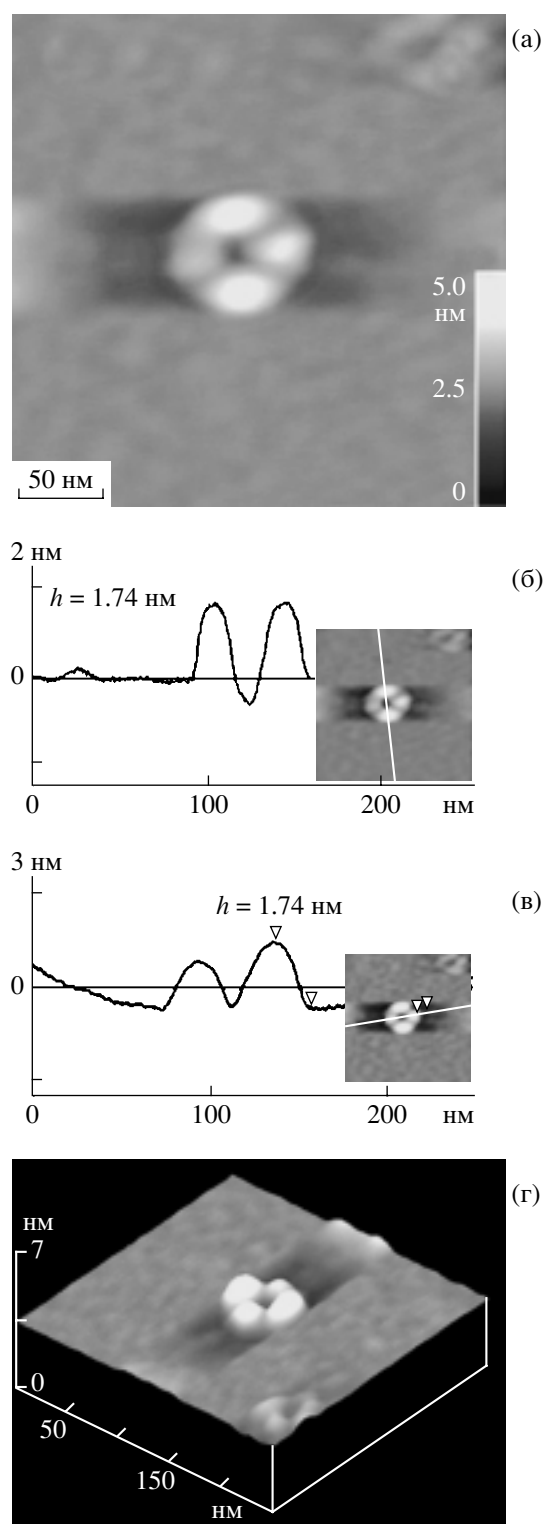
При иммобилизации на поверхности модифицированной аминослюды нами также визуализированы молекулы ДНК, которые имеют значи-

тельно меньшую длину оси суперспирали –  $l = 279$  (рис. 6в) и  $140 \text{ нм}$  (рис. 5г). Поскольку объем обеих молекул соответствует объему единичной молекулы ДНК рGEMEX, можно предположить, что молекула с  $l = 279 \text{ нм}$  (рис. 5в) образована в результате складывания пополам молекулы с  $l = 567 \text{ нм}$  (рис. 5б), а молекула с  $l = 140 \text{ нм}$  (рис. 5г) – в результате складывания пополам молекулы с  $l = 279 \text{ нм}$  (рис. 5в). Таким образом, при иммобилизации молекул ссДНК на поверхности аминослюды с повышенной плотностью аминокрупп визуализированы сверхсуперспиральные ДНК, образующие оси суперспирали второго (рис. 5в) и третьего порядка (рис. 5г), длина которых примерно в два и четыре раза меньше длины оси суперспирали первого порядка (рис. 5б) соответственно.

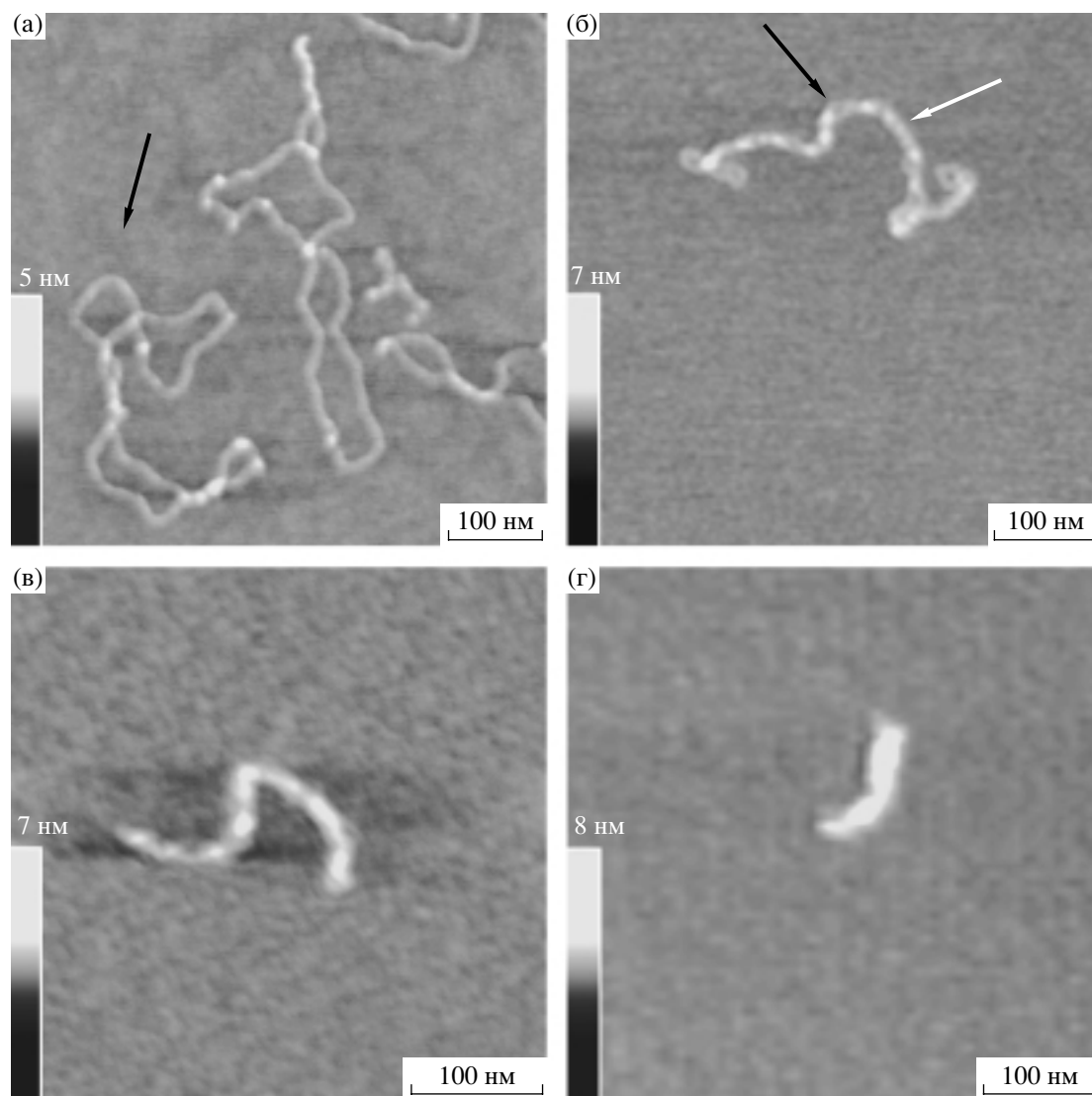
На основе анализа полученных АСМ-изображений нами предложена схема поэтапной компактизации как для единичных молекул ДНК, так и для димеров (рис. 6). Позиции В1, С1, D1, Е1, выделенные прямоугольником, соответствуют димерам ссДНК, что определено на основе вычисления объемов вышеупомянутых молекул, все другие позиции – единичным молекулам. Наименее компактизованные молекулы показаны в позициях А1–А3, наиболее компактизованные – в позициях Е1–Е3. В позиции А3 приведено изображение ссДНК рGEMEX, иммобилизованной на свежесколотой слюде с ионами  $\text{Mg}^{2+}$ . Молекулы ссДНК рGEMEX, иммобилизованные на стандартной аминослюде (А1, А2) с более высоким значением поверхностной плотности заряда по сравнению со свежесколотой слюдой, имеют другой вид. Они также выглядят как плектонемичные молекулы ДНК, но являются более компактизованными, т.е. локализованными на меньшей площади субстрата.

При переходе к модифицированной аминослюде (все другие изображения получены именно на ней), которая характеризуется значительно большей плотностью поверхностного заряда и большей гидрофобностью по сравнению со стандартной аминослюдой, можно видеть несколько вариантов компактизации ссДНК. На первом этапе возрастает количество узлов и образуются сверхсуперспиральные молекулы ДНК (В3), длина суперспиральной оси которых равна приблизительно половине контурной длины релаксированной молекулы, т.е. образуются своеобразные жгуты.

На втором этапе эта жгутоподобная молекула складывается пополам – длина суперспиральной оси уменьшается еще в два раза и составляет приблизительно одну пятую контурной длины релаксированной молекулы (С3, В2, С2). На этом этапе возможно как дальнейшее формирование жгутов (С3), так и образование тороидов (С2). На третьем этапе образуются более короткие жгуты с



**Рис. 4.** АСМ-изображение (а), профили сечения (б) и (в) и трехмерное изображение (г) единичной сверхспиральной ДНК рGEMEX, образовавшей мини-тороид. (а) Размер кадра 250 нм × 250 нм. (б) Высота двух сегментов тороида, через которые проведена секущая плоскость, равна 1.74 нм. (в) Высота двух других сегментов тороида, определенная из профиля сечения, составляет 1.74 и 0.84 нм соответственно. Секущая плоскость проведена через линию, показанную на вставках. Треугольниками показаны соответствующий пик на профиле сечения и уровень, относительно которого была измерена высота большего пика. Высота этого сегмента мини-тороида составляет 1.74 нм. (а, г) Внешний диаметр мини-тороида – 50–60 нм, внутренний – 15–25 нм.



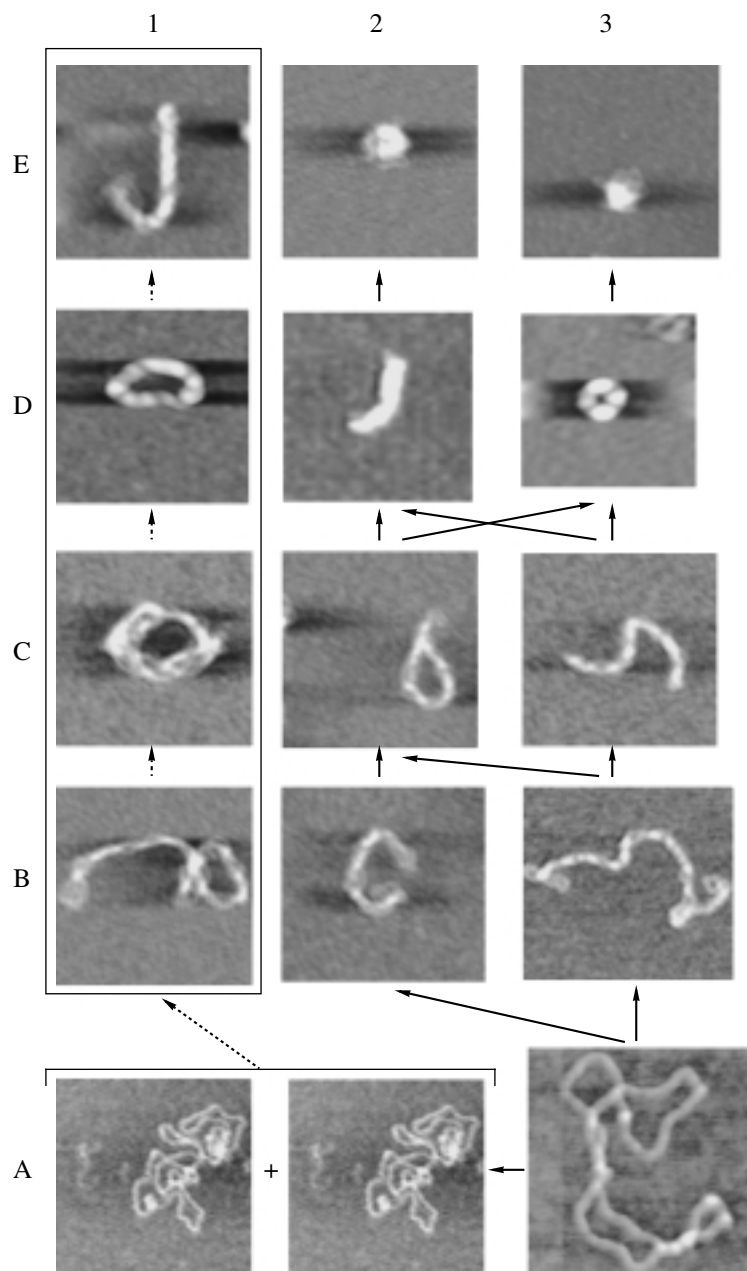
**Рис. 5.** АСМ-изображения суперспиральной ДНК pGEMEX с различной длиной оси суперспирали. ДНК иммобилизована на свежесколотой слюде из буфера, содержащего ионы  $Mg^{2+}$  (а), и на модифицированной аминокислоте (б–г). (а) Длина оси суперспирали составила  $466 \times 5$  нм (для обеих молекул). Молекула, указанная стрелкой, имеет 7 узлов, или взаимных пересечений нитей ДНК, и характеризуется плотностью супервитков  $\sigma = -0.024$ . (б)  $l = 567$  нм,  $\sigma = -0.13$ ; молекула содержит 19 узлов. Черной и белой стрелкой указаны фрагменты ДНК, для которых построены профили поперечного и продольного сечений соответственно, показанные на рис. 7. (в) Сверхсуперспиральная ДНК, характеризующаяся осью суперспирали второго порядка длиной 279 нм и числом узлов, равным семи. (г) Сверхсуперспиральная ДНК, длина на оси суперспирали третьего порядка которой составляет 140 нм. Верхняя граница приведенной шкалы градаций серого, соответствующей значению высоты объекта на записанном изображении, составляет:  $-5$  (а),  $-7$  (б, в),  $-8$  нм (г). Длина отрезка соответствует 100 нм (а–г).

еще вдвое меньшей длиной суперспиральной оси  $l \sim 140$  нм (D2). Кроме этого, возможно формирование мини-ториода (D3) как из ториода (C2), так и из жгутовидной молекулы (C3). На четвертом этапе дальнейшая компактизация ториодов и жгутов приводит к образованию полусфероидов (E2) и сфероидов.

АСМ-изображение этих высококомпактизованных молекул ДНК с высоким разрешением приведено на рис. 7. Интересно отметить, что такие мини-

ториоды возникают как группами (рис. 7а), так и как единичные структуры (рис. 4а).

Пытаясь ответить на вопрос, почему различные молекулы ДНК компактизованы до разного уровня, можно предположить, что (i) на поверхности модифицированной аминокислоты протонированные аминогруппы иммобилизованы неоднородно; (ii) сфероиды и полусфероиды образуются на участках модифицированной аминокислоты с максимальной плотностью активных аминогрупп. Локализация морфологически близких форм



**Рис. 6.** Модель компактизации единичной суперспиральной молекулы ДНК, предлагаемая на основе полученных АСМ-изображений сверхсуперспиральной ДНК рGEMEX. А1, А2 – стандартная аминокислота, А3 – свежесколотая слюда, остальные АСМ-изображения были получены на модифицированной аминокислоте. Стрелки показывают направление этапов дальнейшей компактизации ДНК; прямоугольником выделены четыре димера. При повышении поверхностной плотности заряда, или протонированных аминогрупп (т.е. при переходе от свежесколотой и стандартной аминокислоты к модифицированной аминокислоте), образуются различные топологические варианты компактизованных молекул ДНК. В3 – ссДНК, образующая ось суперспирали 1-го порядка, а контурная длина компактизованной молекулы составляет половину контурной длины релаксированной молекулы; В2, С2, С3 – ссДНК, образующие ось суперспирали 2-го порядка, а контурная длина компактизованной молекулы составляет одну пятую часть контурной длины релаксированной молекулы; D2 – ссДНК, образующая ось суперспирали 3-го порядка (контурная длина составляет одну десятую часть контурной длины релаксированной молекулы); E2, E3 – сфероиды; D3 – мини-тороид, образованный единичной молекулой ДНК. В1, С1, D1 – конденсированные структуры, образованные двумя молекулами ДНК.

ссДНК (мини-тороидов, жгутообразных молекул с длиной оси суперспирали 570 и 280 нм) на участках слюды размером  $\sim 500$  нм  $\times$  500 нм указывает на то, что плотность поверхностного заряда мо-

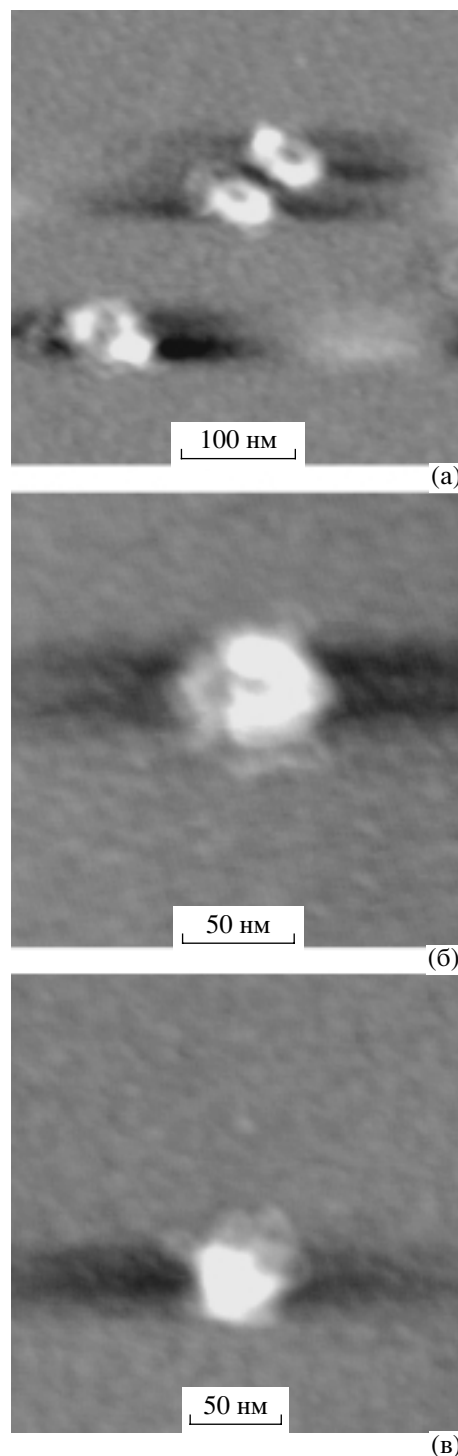
дифицированной аминокислоты варьирует. А наличие такого градиента плотности заряда и приводит к различному экранированию фосфатных групп ДНК и, как следствие, к образованию морфологи-

чески различающихся вариантов компактизованных ссДНК. Кроме того, исследуемый образец ДНК содержит набор топоизомеров, характеризующихся различной плотностью супервитков. В случае, если характерное время компактизации ДНК сравнимо со временем достижения молекулами ДНК поверхности аминокислоты, топоизомеры с различным количеством супервитков могут конденсироваться в агрегаты с различным уровнем компактизации.

Другой вариант компактизации – ссДНК-компактизация не единичных молекул, а димеров. Молекулы, АСМ-изображения которых показаны в позициях В1, С1, D1, E1, образуют димеры, что определено на основе их вычисленных объемов. Сначала две плектонемичные молекулы (А1, А2) образуют жгутообразные структуры (В1). В дальнейшем возможно формирование тороида (С1, D1) или жгута (E1), длина суперспиральной оси которого составляет пятую часть контурной длины релаксированной молекулы. Поз. D2 также соответствует тороиду, образованному двумя молекулами ссДНК.

Таким образом, предложенная модель компактизации ДНК демонстрирует, что в условиях высокой поверхностной плотности заряда субстрата, на котором иммобилизованы молекулы ДНК, возможна компактизация не только димеров, тримеров ДНК, но и единичных молекул ДНК. Использование модифицированной аминокислоты с высоким значением плотности поверхностного заряда приводит к чрезвычайно высокой компактизации единичных суперспиральных молекул ДНК (наряду с компактизацией димеров) вследствие экранирования отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК положительно заряженными протонированными аминогруппами модифицированной аминокислоты.

В отличие от ранее изученной мультимолекулярной компактизации линейных и суперспиральных молекул ДНК нами исследована компактизация единичных молекул ссДНК. При повышении плотности супервитков ДНК происходит не только уменьшение длины суперспиральной оси (повторим, что ранее было показано, что длина оси суперспирали остается неизменной при увеличении плотности супервитков, а ее длина составляет именно 35% контурной длины релаксированной молекулы [38]). Дальнейшая компактизация единичных молекул ДНК сначала характеризуется образованием оси суперспирали второго порядка (длина оси суперспирали составляет 20% контурной длины молекулы), а затем оси суперспирали третьего порядка (длина оси суперспирали составляет около 10% от контурной длины релаксированной молекулы). Другими словами, происходит поэтапное складывание молекулы ДНК в два и четыре раза соответственно. Завершается процесс компактизации



**Рис. 7.** АСМ-изображения компактизованных молекул суперспиральной ДНК рGEMEX. (а) Три мини-торида, образованные единичными молекулами ДНК. Размер кадра 400 нм × 400 нм. (б) Полусфероид, высота которого в максимуме  $h_{\max}$  2.6 нм. Высота некомпактизовавшейся нити ДНК составляет 0.3 нм, что соответствует высоте двухнитевой ДНК. Размер кадра 250 нм × 250 нм. (в) Сфероид, высота которого равна  $h_{\max}$  3.45 нм. Размер кадра 250 нм × 250 нм.

образованием мини-тороидов с диаметром около 50 нм, а также полусфероидов и сфероидов. Незначительное количество визуализированных ссДНК с длиной оси суперспирали  $l \sim 140$  нм (~3%) и полусфероидов (~4%) по сравнению со сфероидами (~17%) свидетельствует, по нашему мнению, о том, что и полусфероиды, и ссДНК, образующие ось суперспирали третьего порядка, являются промежуточными (т.е. кратковременными) формами в процессе компактизации ссДНК до уровня сфероидов.

Известно, что геномная ДНК *E. coli* локализована в сдвоенных по форме нуклеоидах [7]. Степень компактизации ДНК в нуклеоидах, выделенных с добавлением природных мультивалентных полиаминов полилизина, спермина<sup>4+</sup>, спермидина<sup>3+</sup>, подобна уровню компактизации нативных нуклеоидов *in vivo* и существенно выше, чем у нуклеоидов, выделенных в отсутствие поликатионов. Сохранение сдвоенного по форме нуклеоида, а также возможность контроля компактизации ДНК в нуклеоидах *E. coli* посредством изменения концентрации поликатиона указывает на важную роль поликатионов в процессе компактизации геномной ДНК *in vivo*.

Интересно отметить, что теоретическое значение диаметра двойной спирали ДНК (2 нм) значительно отличается от экспериментально измеренных из АСМ-изображений значений высоты (0.3–0.4 нм) и ширины молекулы (7–10 нм), что обусловлено рядом причин. Принято считать, что в случае измерения ширины нити ДНК эффект увеличения диаметра ДНК обусловлен значительным радиусом закругления АСМ-зонда (5–10 нм), недостаточной фиксацией молекул ДНК на подложке и т.д. Однако достоверное совпадение значений теоретически рассчитанного исключенного объема ДНК рGEMEX и объема молекулы ДНК, определенного из АСМ-изображений (см. таблицу), показывает, что увеличение диаметра ДНК при адсорбции на слюде не обусловлено техническими погрешностями измерения. По нашему мнению, несоответствие измеренной ширины и теоретического значения диаметра молекул ДНК обусловлено изменением их конформации под влиянием поверхностных свойств слюды, сопровождающимся значительным уменьшением их высоты, но в то же время сохранением объема. Мы хотели бы особо обратить внимание на это обстоятельство, поскольку в подавляющем большинстве работ по АСМ-визуализации ДНК [4, 28] высокое значение ширины иммобилизованных на слюде молекул ДНК объясняли именно погрешностью измерения микроскопа, а также недостаточной фиксацией биомолекул. Таким образом, предложенное нами объяснение эффекта увеличения диаметра ДНК при АСМ-измерениях устраняет существовавшее противоречие между высочайшим субнанометровым разрешением

АСМ по Z-координате и погрешностью латерального измерения диаметра ДНК.

Теоретические [39] и экспериментальные [24, 40] исследования поверхности аминослюды показали сложность формирования слоев аминосилана на поверхности слюды после обработки слюды в парах АРТЕС. В работе [24] было найдено, что наряду со слоями АРТЕС на поверхности слюды существуют мобильные молекулы АРТЕС, которые не встроены в слои. Именно наличием этих мобильных элементов, которые выполняют роль мультивалентных катионов, объясняли конденсацию ДНК на аминослюде. Проведенные в работе [40] исследования влияния относительной влажности окружающей среды на эффективность иммобилизации линейной ДНК на аминослюде (полученной обработкой в парах недистиллированного АРТЕС, что является крайне важным обстоятельством) показали, что при низкой относительной влажности конденсация ДНК не происходит ввиду отсутствия мобильных молекул АРТЕС на поверхности слюды. Эти результаты согласуются с результатами нашей работы и объясняют образование агрегатов ДНК при использовании недистиллированного АРТЕС, который характеризуется именно повышенной относительной влажностью.

Необходимо принять во внимание также то, что свойства химических соединений на границе раздела жидкость–твердое тело (в данном случае это слюда) и в растворе существенно отличаются. Другими словами, поверхностные свойства субстрата оказывают значительное влияние на молекулы, находящиеся вблизи поверхности. Так, например, известно, что константа ионизации терминальных группировок различных производных силанов, адсорбированных на поверхности слюды (определенная из кривых титрования), уменьшается на 3–6 ед. рН по сравнению с их значениями в растворе [41, 42]. Если рК АРТЕС в растворе составляет ~10 [43], то рК аминогрупп АРТЕС при иммобилизации на поверхности слюды составляет ~7.

Поскольку мы использовали одинаковую процедуру приготовления образца и для модифицированной, и для стандартной аминослюды (для которой были визуализированы только плектонемичные молекулы ссДНК и отсутствовали высококомпактизованные структуры), то это означает, что компактизация молекул ДНК происходит под влиянием поверхностных свойств модифицированной аминослюды. Мы предполагаем, что молекулы ссДНК компактизуются в растворе, вблизи поверхности аминослюды, поскольку в этом случае достигается и определенная конформационная подвижность молекул, и необходимый для компактизации высокий уровень экранирования фосфатных групп ДНК.

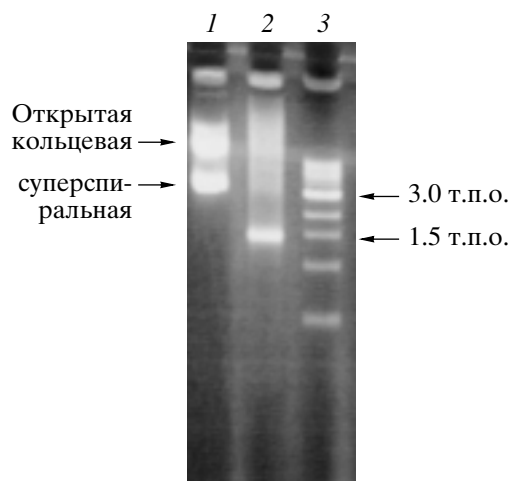
## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы: NEPES, TE-буфер – analytical grade, *N,N*-диизопропилэтиламин – res. grade, слюда – technical grade, аргон – technical grade (Wakenyaku, Япония); 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES) – res. grade (Aldrich); ДНК pGEMEX1 (Promega).

**Приготовление образцов ДНК для АСМ.** В работе использовали ссДНК pGEMEX1 длиной 3993 п.о. без дополнительной очистки (рис. 8). Наличие на электрофореграмме одной полосы для фракции суперспиральной ДНК (которая по подвижности в геле находится на одном уровне с маркером молекулярной массы 4000 п.о.) указывает на гомогенность образца ДНК по длине последовательности. В качестве субстрата применяли свежесколотую слюду, стандартную аминокслоту и модифицированную аминокслоту. Для нанесения ДНК на **свежесколотую слюду** использовали 10 мМ NEPES буфер, содержащий 2.5 мМ  $MgCl_2$  (подчеркнем, что ионы  $Mg^{2+}$  используются только для иммобилизации ДНК на свежесколотой слюде). На полоску **аминослюды или модифицированной аминокслоты** размером 1 см<sup>2</sup> наносили каплю раствора ДНК в TE-буфере (10 мМ Трис-НСl рН 7.9, 1 мМ EDTA) без ионов магния объемом 10 мкл, промывали после 2-минутной экспозиции деионизованной водой, обдували потоком аргона и выдерживали образец при давлении 100 мм рт. ст. в течение 20 мин. Для визуализации единичных молекул исходный раствор ДНК с концентрацией 2 мкг/мл разбавляли TE-буфером до концентрации 0.022 мкг/мл с тем, чтобы детектировать 7–10 молекул для кадра 2 мкм × 2 мкм и обеспечить приемлемую для статистической обработки частоту компактизованных молекул.

Получение **стандартной аминокслоты** осуществляли согласно методике работы [29] посредством модификации свежесколотой слюды аминокслогруппами в парах перегнанного APTES и *N,N*-диизопропилэтиламина. Дистилляцию APTES проводили при уменьшенном давлении в атмосфере аргона. Для аминомодификации свежесколотую слюду инкубировали в стеклянном эксикаторе объемом 2.5 л, заполненном аргоном, с растворами APTES и *N,N*-диизопропилэтиламина 1 ч. Модифицированную слюду хранили в эксикаторе в атмосфере аргона на протяжении одного месяца. Для приготовления буферных растворов и образцов ДНК использовали ультрачистую воду с удельным сопротивлением ~ 17 МОм см, полученную с помощью установки Milli Q (Millipore, США).

**Модифицированная аминокслота** была получена с помощью небольших изменений технологии получения стандартной аминокслоты [20]. Коротко: процедура состояла в использовании трехкратно дистиллированного APTES для модификации свежесколотой слюды в стеклянном эксикаторе



**Рис. 8.** Анализ суперспиральной ДНК pGEMEX1 после проведения электрофореза в 2% агарозном геле и последующего окрашивания бромистым этидием. Дорожка 1 – ссДНК pGEMEX1 с ожидаемой длиной 3993 п.о.; 2 – ампликон длиной 1400 п.о.; 3 – маркер молекулярной массы (1000 п.о.). Выделен маркер длиной 3000 п.о. за счет более высокой интенсивности.

объемом 2.5 л, заполненном аргоном. Раствор APTES объемом 120 мкл в крышке от пластиковой микропробирки помещали на 4 ч на дно эксикатора, а *N,N*-диизопропилэтиламин объемом 40 мкл – на 5 ч. Дистилляцию APTES проводили при уменьшенном давлении в атмосфере аргона. Для аминомодификации слюды свежесколотую слюду выдерживали в эксикаторе в парах APTES и *N,N*-диизопропилэтиламина в течение 24 ч. Для характеристики как стандартной, так и модифицированной аминокслоты использовали количество иммобилизованных молекул ссДНК pGEMEX на площади 4 мкм<sup>2</sup>. Период полуактивности стандартной аминокслоты составлял около 14 сут, т.е. после ее хранения в атмосфере аргона количество иммобилизованных молекул ДНК уменьшалось в два раза. В то же время период полуактивности модифицированной аминокслоты составлял около 28 дней, что указывало на вдвое большее количество протонированных аминокслогрупп по сравнению со стандартной аминокслотой, т.е. свидетельствовало о приблизительно 100% протонировании аминокслогрупп.

**Атомно-силовая микроскопия.** Использовали атомно-силовую микроскоп Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) с E-сканером (имеющим максимальный диапазон 12 мкм). АСМ-изображения ДНК были записаны посредством вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме “высота” при комнатной температуре. Сканирование проводили с помощью OMCL-AC160TS кантилеверов (Olympus Optical Co., Япония), характеризующихся резонансной частотой

340–360 кГц и константой жесткости 42 Н/м, при частоте сканирования 3 Гц. Изображения были получены в формате 512 × 512 пикселей, сглажены и проанализированы с помощью программного обеспечения Nanoscope (версия 5.12r3, Veeco Instruments Inc., США).

Объем молекул ДНК рассчитывали на основе реально измеренных параметров молекул из АСМ-изображения – высоты, длины и ширины молекул ДНК. Для более точного измерения объема молекул использовали построение продольных, как правило, и поперечных сечений молекул с помощью встроенной опции программного обеспечения Nanoscope.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была частично поддержана Japanese Society for the Promotion of Science (Япония). Авторы выражают благодарность Лиманской О. Ю. (Институт микробиологии и иммунологии АМН Украины) и Шестопаловой А.В. (Институт радиофизики и электроники НАН Украины) за помощь и критические замечания при подготовке статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim J., Yoshimura S., Hizume K., Ohniwa R., Ishihama A., Takeyasu K. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 1982–1992.
- Hizume K., Yoshimura S., Maruyama H., Kim J., Wada H., Takeyasu K. // *Arch. Histol. Cytol.* 2002. V. 65. P. 405–413.
- Gonzalez-Huici V., Salas M., Hermoso J. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 2306–2314.
- Yoshimura S., Hizume K., Murakami A., Sutani T., Takeyasu K., Yanagida M. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. P. 508–513.
- Morgan J., Blankenship J., Mattheus H. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 3643–3649.
- Zinchenko A., Yoshikawa K. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. P. 4118–4123.
- Dame R., Wyman C., Goosen N. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3504–3510.
- Kemura K., Rybenkov V., Crison N., Hirano T., Cozzarelli N. // *Cell.* 1999. V. 98. P. 239–248.
- Sato M., Ura K., Hohmura K., Tokumasu F., Yoshimura S., Hanaoka F., Takeyasu K. // *FEBS Lett.* 1999. V. 452. P. 267–271.
- Martinkina L., Klinov D., Kolesnikov A., Yurchenko V., Streltsov S., Neretina T., Demin V., Vengerov Y. // *J. of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2000. V. 17. P. 687–695.
- Martinkina L., Kolesnikov A., Streltsov S., Yurchenko V., Vengerov Y. // *J. of Biomolecular Structure and Dynamics.* 1998. V. 15. P. 949–957.
- Golan R., Pietrasanta L., Hsieh W., Hansma H. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 14069–14076.
- Allen M., Bradbary E., Balhorn R. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2221–2226.
- Dunlap D., Maggi A., Soria M., Monaco L. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3095–3101.
- Bloomfield V. // *Biopolymers.* 1997. V. 44. P. 269–282.
- Fang Y., Hoh J. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 588–593.
- Cherny D., Jovin T. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 295–307.
- Hud N., Downing K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 14925–14930.
- Lin C., Wang C., Feng X., Liu M., Bai C. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3228–3234.
- Лиманский А.П., Лиманская О.Ю., Волянский А.Ю., Руденко С.С., Драч М.И., Лиманская Л.А., Климов О.И. Способ модификации слюды, субстрата для атомно-силовой микроскопии: Патент Украины 13571// Промислова власність. 2006. № 4. С. 6.
- Butt H. // *Biophys. J.* 1991. V. 60. P. 1438–1444.
- Bezanilla M., Drake B., Nudler E., Kashlev M., Hansma P., Hansma H. // *Biophys. J.* 1994. V. 67. P. 2454–2459.
- Lyubchenko Y., Shlyakhtenko L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 496–501.
- Fang Y., Hoh J. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 588–593.
- Umemura K., Ishikawa M., Kuroda R. // *Analytical Biochem.* 2001. V. 290. P. 232–237.
- Лиманская О.Ю., Лиманская Л.А., Лиманский А.П. // *Биополимеры и клетка.* 2005. Т. 21. С. 515–524.
- Лиманская О.Ю., Лиманская Л.А., Лиманский А.П. // *Биополимеры и клетка.* 2006. Т. 22. С. 18–28.
- Shlyakhtenko L., Gall A., Weimer J., Hawn D., Lyubchenko Y. // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 568–576.
- Manning G. // *Q. Rev. Biophys.* 1978. V. 11. P. 179–2-6.
- Anderson C., Record M. // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1995. V. 46. P. 657–7-0.
- Matulis D., Rouzina I., Bloomfield V. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296. P. 1053–1063.
- Франк-Каменецкий М., Анишелевич В., Лукашин А. // *Успехи физ. наук.* 1987. Т. 151. С. 595–618.
- Matulis D., Rouzina I., Bloomfield V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. P. 7331–7342.
- Korolev N., Lyubartsev A., Laaksonen A., Nordenskiöld L. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 5971–5981.
- Reiner C., Stroh C., Ebner A., Klampfl C., Gall A., Romanin C., Lyubchenko Y., Hinterdorfer P., Gruber H. // *Anal. Chimica Acta.* 2003. V. 479. P. 59–75.
- Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S., Henderson E., Lyubchenko Y. // *Probe Microscopy.* 2002. V. 2. P. 227–234.
- Hansma H., Golan R., Hsieh W., Lollo C., Mullen-Ley P., Kwok D. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 2481–2487.
- Boles T., White J., Cozzarelli N. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 213. P. 931–951.
- Fujimoto B., Schurr J. // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 3286–3291.



40. Crampton N., Bonass W.A., Kirkham J., Thomson N.H. // *Langmuir*. 2005. V. 21. P. 7884–7891.
41. Vezenov D., Noy A., Rozsnyai L., Lieber C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 2006–2015.
42. Zhang H., He H., Wang J., Mu T., Liu Z. // *Appl. Phys.* 1998. V. A66. P. S269–S271.
43. Лиманский А.П. // *Биополимеры и клетка*. 2001. Т. 17. С. 292–297.

**Engl**