

Т. Н. ЕВРЕИНОВА, Т. В. МАМОНТОВА, Л. Л. ЛИТИНСКАЯ, Ю. Р. ХРУСТ

ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ В КОАЦЕРВАТНЫХ СИСТЕМАХ

ПЕРОКСИДАЗА И СТАБИЛИЗАЦИЯ КОАЦЕРВАТНЫХ КАПЕЛЬ

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 VII 1971)

Рассматриваемые в данном сообщении гидрофильные коацерватные системы, состоящие из капель диаметром от 10^{-5} до 10^{-2} см и окружающей их равновесной жидкости представляют интерес как одна из предклеточных моделей объединения молекул на пути к жизни по теории академика А. И. Опарина (4). Кроме того, такие системы могут быть использованы для концентрирования молекул из больших объемов растворов в малые, а также для адсорбции красителей и других соединений и для выяснения особенностей поведения ферментов в жидких гетерогенных системах и в протоплазме (4). Во всех этих случаях имеет значение длительность существования коацерватных капель, т. е. их устойчивость. Устойчивость капель зависит от их химического состава и от времени. Как правило, коацерватные капли после своего возникновения довольно быстро оседают на дно сосуда под действием силы тяжести и сливаются (коалесцируют) друг с другом, образуя коацерватный слой. Особенно не стойки системы, полученные с участием сывороточного альбумина крови.

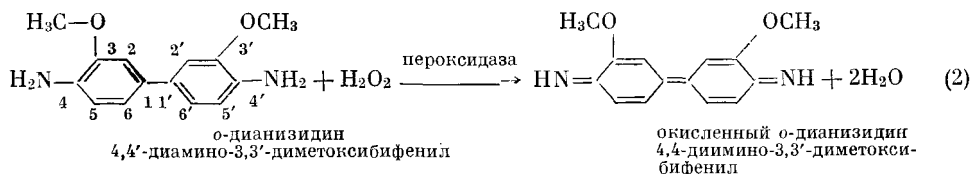
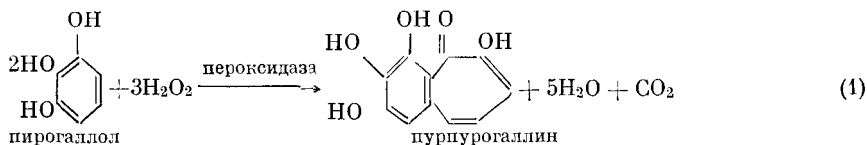
Впервые значительная стабилизация капель была достигнута благодаря ферментной реакции окисления фенолов в хиноны с помощью фермента полифенолоксидазы в белково-углеводной коацерватной системе. Капли с хинонами сохранялись в течение 2 лет и больше (2).

Целью предлагаемой работы является исследование влияния продуктов окислительных реакций, осуществляемых пероксидазой в коацерватных системах, на стабилизацию капель. Для опытов применяли гистон, выделенный из зобной железы теленка по методу Хнилицы (6), и препараты ДНК, пирогаллола, *o*-дианизидина и пероксидазы (1.11.1.7) английской фирмы ВДН. Удельная активность пероксидазы, где субстратом служили пирогаллол и H_2O_2 , составляла 572 единицы, а в случае использования *o*-дианизидина 690 единиц (3, 5). Фермент включали в коацерватные системы I — II, получаемые путем смешивания водных растворов в следующей последовательности:

I. Белковоуглеводная система — гистон — гумми в мл: H_2O 0,3—0,8; 0,5 *M* ацетатный буфер (рН 6) 0,2; 0,67% арабинат натрия — (гумми) 0,5; 0,01% пероксидаза 0,1; 1% гистон 0,4; 0,5% H_2O_2 0,2- и дополнительный субстрат.

II. Белковонуклеиновая система — гистон — ДНК в мл: H_2O 0,3—0,8; 0,5 *M* ацетатный буфер (рН 6) 0,2; 1% гистон 0,4; 0,01% пероксидаза 0,01; 0,5% ДНК 0,4; 0,5% H_2O_2 0,2 и дополнительный субстрат. Кроме H_2O_2 , дополнительными субстратами для пероксидазы служили 0,2% водный раствор пирогаллола 0,5 мл или 0,5% раствор *o*-дианизидина в абсолютном метаноле 0,5 мл. Коацерватные капли возникали при взаимодействии гистона с гумми и гистона с ДНК. Инкубирование проводили при 20° в течение 20 мин. с пирогаллолом и 30 мин. с *o*-дианизидином. По окончании опыта реакцию останавливали инаktivированием фермента KCN.

Пероксидаза окисляла субстраты согласно уравнениям (1) — (2):



Низкомолекулярные субстраты распределялись более или менее равномерно между каплями и равновесной жидкостью, свободно проникая в

Таблица 1

Содержание продуктов окисления пирогаллола и *o*-дианизидина пероксидазой в коацерватных каплях

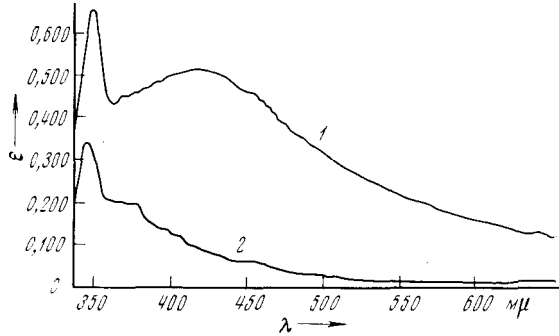
№№ капель	Диаметр, 10 ⁻⁴ см	Объем, 10 ⁻¹² см ³	Продукты окисления	
			Вес 10 ⁻¹² г	Концентрация, %
Гистон — гумми — пирогаллол — хиноны				
1	3,2	12,85	0,26	2,2
2	3,1	16,9	0,21	1,3
3	5,1	68,1	0,61	0,9
4	6,1	119,1	0,83	0,7
Гистон — ДНК — пирогаллол — хиноны				
5	2,0	4,2	0,06	1,4
6	4,4	44,6	0,09	0,2
7	6,3	130,8	0,17	0,1
Гистон — гумми — <i>o</i> -дианизидин — окисленный <i>o</i> -дианизидин				
8	2,2	5,45	0,062	1,13
9	3,3	19,54	0,21	1,08
10	4,4	44,66	0,329	0,73
11	5,3	80,0	0,49	0,62
Гистон — ДНК — <i>o</i> -дианизидин — окисленный <i>o</i> -дианизидин				
12	2,6	8,8	0,102	1,16
13	4,4	44,2	0,33	0,75
14	5,6	94,2	0,55	0,58
15	6,4	137,78	0,57	0,41

капли и выходя из них. В то же время продукты окисления пирогаллола и *o*-дианизидина накапливались в каплях. Капли окрашивались в желто-коричневый цвет и приобретали устойчивость, причем стабилизация капель шла значительно быстрее и полнее в тех случаях, где субстратом служил пирогаллол, который окислялся до пурпурогаллина, относящегося к классу хинонов. *o*-Дианизидин был нами взят на том основании, что он является международным субстратом-эталоном для определения активности препаратов пероксидазы и в результате окисления дает два цикла и иминогруппу вместо аминогруппы. Окисленный *o*-дианизидин не относится к хинонам. Количественные измерения содержания окисленных продуктов в индивидуальных коацерватных каплях проводили на цитоспектрофотометре МУФ-5 в лаборатории академика Г. М. Франка в Институте биофизики АН СССР совместно с В. Н. Карнауховым, за что приносим ему большую благодарность. Кроме МУФ-5, использовали экспериментальную установку СИМ-1 — сканирующий интегрирующий микрофотометр, позволяющий быстро и с высокой точностью определять по оптической плотности количество вещества, площадь, диаметр клеток и коацерватных капель. Оптическую плотность измеряли в максимальных длинах волн для окисленного пирогаллола при 420 мμ, а для окисленного *o*-дианизидина при 437 мμ. Расчет концентраций и содержания окисленных продуктов вели по формулам, приведенным в нашей работе (4). Молярные коэффициенты абсорбции были взяты из статей (5, 7) и проверены на спектрофотометрах СФ-4 и

«Uniscam». Погрешность методов составляла 2—4% от определяемой величины.

В каждой коацерватной системе было измерено свыше 200 капель. Наибольшая часть результатов показана на рис. 1 и в табл. 1. Из данных спектра и табл. 1 следует, что продукты окисления концентрируются в каплях, причем в мелких каплях концентрация выше, чем в крупных. Подобное

Рис. 1. Спектр коацерватной системы (капли (1) и равновесной жидкости (2)). Пероксидаза — гистон — гумми — пирогаллол — хиноны, снятый на МУФ-5. 1 — $d = 6,30 \mu$, 2 — толщина слоя 180 μ . Ордината E — оптическая плотность. Абсцисса λ — длина волны в $m\mu$



явление имеет место и для других соединений (1), белков, нуклеиновых кислот и т. д. (1).

Концентрация хинонов в каплях колебалась в пределах от 0,003 до 6—8%. Даже незначительное содержание хинонов сильно стабилизирует капли. Например, в капле диаметром в 6,3 μ на две молекулы гистона (молекулярный вес 15 000) приходилась одна молекула хинона — пурпурогаллина (молекулярный вес 231). Возможно стабилизация сопровождается образованием сшивок между полимерными молекулами.

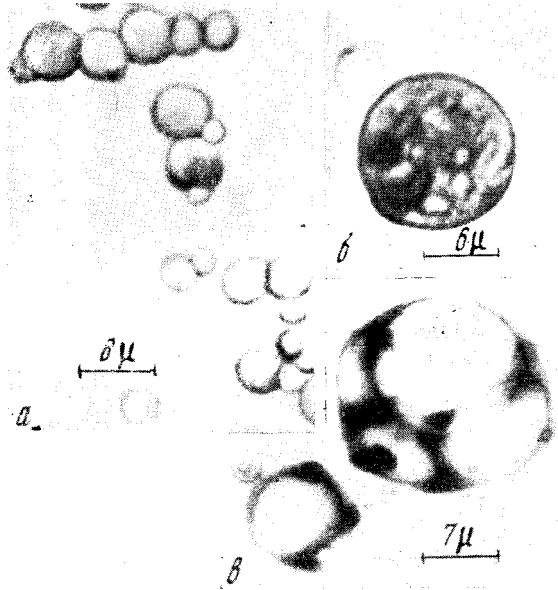


Рис. 2. Влияние ионной силы на белково-углеводные капли, содержащие пероксидазу и хиноны в коацерватной системе гистон — гумми — пирогаллол — окисленный пирогаллол. Ионная сила: а — 0,068, б — 0,23, в — 0,27—0,32

Капли сохраняют устойчивость. Капли той же системы, но без хинонов в этих условиях растворяются.

Полученные результаты могут представлять интерес для вопросов, связанных с происхождением жизни, и для стабилизации полимерных молекул в клетках и в гидрофильных коацерватных системах.

Авторы сердечно благодарят академика А. И. Опарина за его постоянное внимание к нашим исследованиям и за советы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Н. Евреинова, Концентрирование веществ и действие ферментов в коацерватах, «Наука», 1966. ² Т. Н. Евреинова, А. Бэйли, ДАН, 179, 723 (1968).
³ Т. Н. Евреинова, Т. В. Мамонтова и др., Журн. эволюцион. биохим. и физиол., 7, 23 (1971). ⁴ А. И. Опарин, Жизнь, ее природа, происхождение и развитие, Изд. АН СССР, 1960. ⁵ Enzymes and Related Biochemicals «Seravac», Cape Town, 1963. ⁶ L. Hnilica, S. Hupka, Biologia, Bratislava, 14, 821 (1959).
⁷ Moller Knud, Ottolenghi Paul, C. R., 35, 369 (1966). ⁸ Worthington Catalog of Enzymes, New Jersey, USA, 1968.