

УДК 543.422.062 : 535.243.25 : 535.361.13.541.18.041.8 : 576.11 БИОХИМИЯ

К. Л. ГЛАДИЛИН, А. Ф. ОРЛОВСКИЙ, Т. Н. ЕВРЕЙНОВА
академик А. И. ОПАРИН

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНИХ РАЗМЕРОВ И КОЛИЧЕСТВА КОАЦЕРВАТНЫХ КАПЕЛЬ ПО СПЕКТРУ ТИНДАЛЯ

Гидрофильные коацерватные системы состоят из капель и равновесной жидкости. Они образуются при смешивании растворов белков, нуклеиновых кислот, углеводов и других полимеров, а также в цитоплазме. В каплях происходит значительное концентрирование соединений⁽¹⁾. Благодаря этому свойству коацерватные капли представляют интерес как одна из предклеточных моделей для исследования процесса возникновения жизни на Земле⁽²⁾, а также для изучения работы в них ферментов и для практических целей⁽⁴⁾.

Изучение образования коацерватов и процессов, в них протекающих, требует подбора оптимальных концентраций соединений, из которых могут быть получены коацерватные капли с определенными размерами и в количестве, необходимом для моделирования ферментных реакций и других процессов в коацерватных системах.

При образовании коацерватных капель диаметром от 0,5 до 500 мкм наблюдается помутнение смеси прозрачных до этого растворов. Величина помутнения смеси может служить показателем степени коацервации. Так, Бунгенберг-де-Йонг определял величину мутности в нефелометре и судил по ней о процессах коацервации в различных системах⁽³⁾. Однако средние размеры и количество капель в системе не определялись. Кроме того, метод нефелометрии недостаточно точный, так как в нем используется не монохроматический свет, а участок спектра, выделяемый светофильтром. С другой стороны, с помощью спектрофотометра можно определить и средние размеры частиц, и их количество по оптической плотности при двух различных длинах волн, т. е. по спектру Тиндаля или дифференциальному спектру мутности⁽⁴⁾. Таким методом были рассчитаны средние размеры частиц и их количество в суспензиях различных бактерий⁽⁵⁾ и других дисперсных системах^(6, 7).

Отличие коацерватов от различных суспензий и эмульсий заключается в том, что они представляют собой гидрофильные капли в окружающей их гидрофильной жидкости. Однако до сих пор каких-либо данных по использованию метода светорассеяния при изучении коацерватных систем нами в литературе не найдено. Поэтому цель предлагаемого исследования заключается в применении более точного и полного спектрофотометрического метода для определения средних размеров и количества капель в коацерватных системах различного состава и устойчивости.

Сущность метода заключается в том, что любая частица суспензии или эмульсии, любая клетка или коацерватная капля, находясь в среде с показателем преломления, отличным от ее показателя преломления, рассеивает падающий на нее свет. По степени рассеяния света, измеряемой величиной оптической плотности, можно судить о количестве частиц и их средних размерах:

$$D = K \frac{NV^2}{\lambda^p}, \quad (1)$$

где D — оптическая плотность системы, K — коэффициент пропорциональности, N — количество частиц в мл, V — средний объем частиц, λ — длина

волны света, а p — показатель преломления, величина которого зависит от относительных размеров длины волны света и частиц.

Коацерватные системы не поглощают света при используемых нами длинах волн. Поэтому величину показателя степени p находим, проводя измерение оптической плотности при двух разных длинах волн и производя вычисления по формуле (2), легко выводимой из (1):

$$p = (\lg D_1 - \lg D_2) / (\lg \lambda_2 - \lg \lambda_1), \quad (2)$$

где D_1 — оптическая плотность системы при длине волны λ_1 , а D_2 — при λ_2 .

Определение среднего размера коацерватных капель. Средний диаметр капель находим по формуле (3)

$$d = \frac{V \sqrt{\lambda_1 \lambda_2}}{\pi n} \alpha, \quad (3)$$

где n — показатель преломления равновесной жидкости, равный, как было установлено нами, 1,334; α — относительный размер капель, который находим из таблиц (4), для относительного коэффициента преломления, равного 1,05, характерного в среднем для коацерватных капель.

Учитывая сферичность коацерватных капель, средний объем определяем по формуле (4)

$$V = \frac{\pi}{6} d^3. \quad (4)$$

Приведенные выше формулы справедливы лишь для размеров частиц, соизмеримых с длиной волны, т. е. величины α должны быть в интервале от 0,2 до 25—40, что соответствует p от 3,9 до 1,3—0,4.

Определение количества капель в системе. Оптическая плотность системы пропорциональна количеству коацерватных капель (5):

$$D = 0,434 NR, \quad (5)$$

где 0,434 — коэффициент перехода от натуральных логарифмов к десятичным, R — величина света с длиной волны 0,546073 μ (зеленая линия ртути), рассеянного одной каплей, находится из таблиц (5) * или (5) по найденной ранее величине α .

Расчет количества частиц проводим по формуле

$$N = \frac{1/2 (D_1 - D_2)}{0,434 R l \lambda_1 \lambda_2 / 0,546^2}, \quad (6)$$

где $\lambda_1 \lambda_2 / 0,546^2$ — коэффициент пересчета R от величины, данных в таблицах для зеленой линии ртути, к использованным в работе длинам волн; l — толщина системы по ходу лучей.

Статистическую обработку результатов проводили по формулам вариационной статистики. Величина средней квадратичной ошибки для оптимальных концентраций исходных растворов не превышает 5%. Количество параллельных удовлетворяет обычным требованиям надежности (0,95) при определении средних величин.

Получение коацерватных систем. Для получения коацерватных систем использовали следующие препараты: гистон зубной железы теленка (16% азота), любезно предоставленный Т. В. Мамонтовой; гуммиарабик фирмы «Mergsk» и ДНК фирмы «BDH». Концентрации исходных растворов гистона, гуммиарабика и ДНК указаны в табл. 1.

Последовательность сливания: вода дистиллированная (по расчету до суммарного объема 1 мл); 0,1 мл 0,5 N натрий-ацетатного буфера pH 6,0; 0,25 мл водного раствора гуммиарабика, а затем 0,2 мл водного раствора гистона, или 0,2 мл водного раствора ДНК, затем 0,25 мл гистона.

Стабилизацию капель осуществляли при помощи ферментной реакции окисления *o*-дианизидина в 4',4'-димино-3',3'-диметоксибифенил или ци-

* В таблице (5) допущена опечатка: вместо $R \times 10^{10}$ следует читать $R \times 10^{-10}$.

Таблица 1

Средние размеры и число капель в коацерватных системах

№№ п.п.	Диаметр, μ	Объем, μ^3	Число ка- пель, $10^6/\text{мл}$	Концентрация исходных растворов, %
------------	-------------------	----------------	--	---------------------------------------

Нестабилизированные системы

1	5,5	90	3,9	Гистон 0,25	Гуммиарабик 0,17
2	6,3	130	5,3	0,5	0,34
3	7,0	180	8,6	1,0	0,67
4	9,1	390	7,2	2,0	1,34
5	10,2	550	6,8	4,0	2,68
6	5,2	80	9,3	Гипсон 0,25	ДНК 0,125
7	5,8	100	14,4	0,5	0,25
8	7,8	240	13,8	1,0	0,5
9	10,7	640	5,5	2,0	1,0

Системы, стабилизированные 4',4'-диимино-3',3'-диметоксибифенилом

10	5,9	110	8,4	Гистон 0,25	Гуммиарабик 0,17
11	8,8	360	4,5	1,0	0,67
12	5,7	100	8,9	Гипсон 0,25	ДНК 0,125
13	9,0	380	2,9	1,0	0,5

Системы, стабилизированные пурпурогаллином

14	6,4	140	4,6	Гистон 0,25	Гуммиарабик 0,17
15	9,8	500	1,8	1,0	0,67
16	7,0	180	5,0	Гипсон 0,25	ДНК 0,125
17	10,4	590	2,9	1,0	0,5

Примечание. Жирным шрифтом выделены оптимальные системы (см. рис. 1б); подчеркнуты — системы с флокулятами (см. текст и рис. 1е).

рогаллола в пурпурогаллин, катализируемой пероксидазой в присутствии перекиси водорода. Пероксидазу корней хрена фирмы «Light» добавляли в количестве 0,05 мл 0,01% водного раствора перед добавлением гистона. После гистона через 20 сек. приливали 0,1 мл 0,5% H_2O_2 , а далее еще через 20 сек. 0,05 мл 0,5% *o*-дианизидина или 0,25 мл 0,2% пирогаллола фирмы «BDH». После этого через 30 сек. реакцию останавливали добавлением 0,025 мл 0,52% раствора азида натрия.

Запись оптической плотности системы производили на регистрирующем спектрофотометре «Unicum» SP700.

Результаты опытов представлены на рис. 1 и в табл. 1. На рис. 1 в качестве примера взята коацерватная система гистон — ДНК и приведена запись оптической плотности с четырехкратной повторностью для различных концентраций исходных растворов. Для более точного определения средней величины оптическая плотность каждого опыта записывалась попеременно при двух длинах волн: 1 и 1,3 μ (10). Получаемые при этом разрывы в записи для каждой из длин волн восстанавливались интерполяцией (на рис. 1 эти участки изображены пунктирной линией; сплошная линия — запись, даваемая прибором).

Из данных рис. 1 следует, что наименьшие расхождения между параллельными опытами наблюдаются для системы, представленной на рис. 1б (№ 9 в табл. 1). При уменьшении и увеличении концентраций исходных растворов расхождения большие (рис. 1а, в), а для более высоких концентраций происходит образование не только коацерватных капель, но и флокулятов (хлопьев), о чем свидетельствует волнистый характер записи оптической плотности (рис. 1г), возникающий в результате того, что хлопья пересекают лучи света.

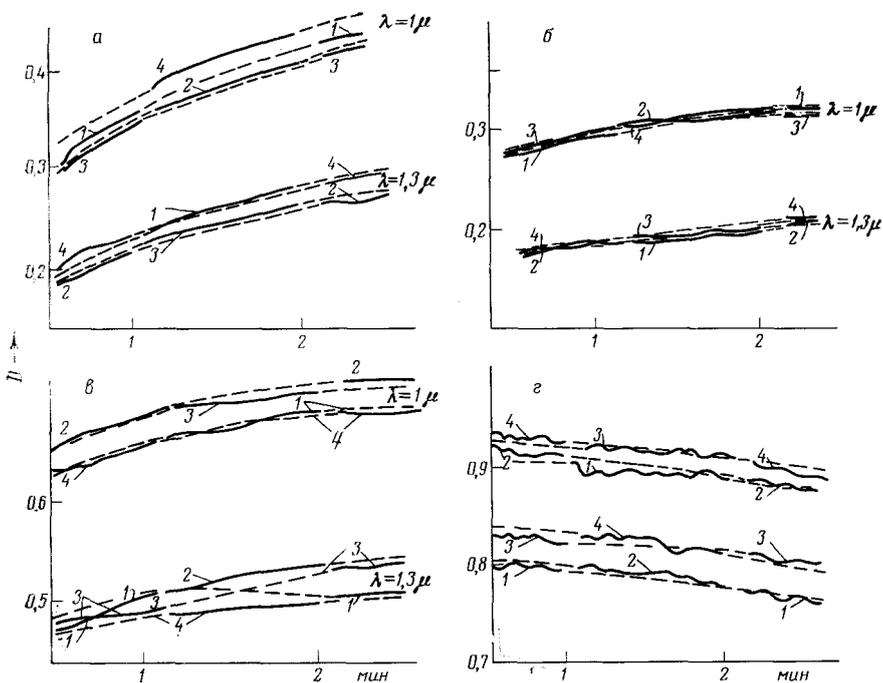


Рис. 1. Характеристика коацерватной системы гистон — ДНК по оптической плотности в зависимости от концентрации исходных растворов. Концентрации: а — низкая, б — оптимальная, в — высокая, г — начинается флуктуация (см. табл. 1: №№ 6—9). Цифры у кривых записи — номера параллельных опытов. По оси абсцисс — время с момента образования коацервата

Средние размеры капель, вычисленные для первых двух систем (табл. 1), хорошо согласуются с литературными данными⁽¹⁾, полученными при просчитывании коацерватных препаратов на анализаторе биочастиц. Следует отметить, что предложенный нами метод имеет определенные преимущества перед анализатором биочастиц, так как он дает возможность быстро и с большой точностью определить в малых объемах коацерватов: 1) количество капель (порядка миллионов и более); 2) их средний (из миллионов капель) диаметр и объем; 3) зависимость средних размеров и количества капель от концентрации исходных растворов и оптимальные концентрации для образования коацерватных систем; 4) установить присутствие флуктуатов и 5) следить за изменением коацерватных систем во времени, а также при моделировании в них ферментных реакций.

Авторы благодарят И. Н. Влодавца за ценные советы при выполнении данной работы и Т. В. Мамонтову за помощь в работе по получению коацерватных систем и предоставление препаратов.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Н. Евреипова, Концентрирование веществ и действие ферментов в коацерватах, «Наука», 1966. ² А. И. Опарин, Возникновение и начальное развитие жизни, М., 1966. ³ H. G. Bungenberg de Jong, La coacervation, les coacervates, leur importance en biologie, 1, Généralités et coacervates complexes, 2, Coacervates autocomplexes, Paris, 1936. ⁴ W. Heller, H. L. Bhatnagar, M. Nakagaki, J. Chem. Phys., 36, 5, 1163 (1960). ⁵ Б. А. Фихман, В. Г. Петухов, В сборн. Биоэнергетика и биологическая спектроскопия, «Наука», 1967, стр. 209. ⁶ И. Я. Слоним, Оптика и спектроскопия, 8, 1, 98 (1960). ⁷ В. В. Шудейкин, Физика моря, гл. 6, «Наука», 1968. ⁸ W. J. Pangonis, W. Heller, A. Jacobson, Tables of Light Scattering Function for Spherical Particles, Detroit, 1957. ⁹ W. Heller, H. J. McCarty, J. Chem. Phys., 29, 1, 78 (1958). ¹⁰ К. Л. Гладилин, ДАН, 20, 1, 226 (1972).