

А. Ф. КРЕТОВА, Г. А. ПОПОВА, А. С. ТИХОНЕНКО

**ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА ПРОТЕОЦИНА Д52 *PROTEUS MIRABILIS*
СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ АНТИТЕЛАМИ**

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 14 VI 1971)

Изучение ультраструктуры антител и их взаимодействия с антигеном давно привлекало внимание исследователей. Однако в литературе имеется небольшое количество работ на эту тему, так как исследование в этом направлении сопряжено с трудностями методического характера. Алмейда и др. ⁽¹⁾ при изучении вируса полиомы с антителами кролика удалось показать, что молекулы антител имеют форму цилиндрических палочек длиной 250—270 Å и диаметром 35—40 Å. Гото и др. ⁽²⁾, исследуя комплекс флагеллы с антителами, установили, что толщина слоя антител прикрепленных к антигену, составляет 95 Å. При этом авторы наблюдали на поверхности антигена структуры, которые, по их предположению, представляют собой изогнутые в виде «дуги» молекулы антитела, прикрепленные к флагелле двумя активными центрами. Подобные дугообразные структуры наблюдали Лафферти и Оертелис ⁽³⁾ при исследовании комплекса вируса гриппа с антителами.

Наиболее точная информация о тонкой структуре и размерах γG-глобулина была получена Валентайном и Грином ⁽⁴⁾ при исследовании антител в комплексе с гаптенем. Эти авторы убедительно показали, что молекула антитела в комплексе с антигеном имеет вид буквы Y и что угол между F ab фрагментами может изменяться от 0 до 180°. Длина молекулы антитела составляет 120 Å. Следует отметить, что данные Валентайна и Грина согласуются с результатами физико-химических исследований ⁽⁵⁻⁷⁾.

Целью настоящей работы было исследование ультраструктуры комплекса дефектного фага со специфическими антителами.

Дефектный фаг, используемый в работе в качестве антигена, продуцируется дефектно-лизогенным штаммом *Proteus mirabilis* Д52 и назван нами протеоцином Д52. Он представляет собой дефектные частицы фага, напоминающие по строению отростки Т-четных фагов *Escherichia coli* (рис. 1А).

Для получения протеоцина Д52 культуру *Proteus mirabilis* Д52 выращивали на среде, содержащей на 1 л воды 8,5 г Na_2HPO_4 , 3 г KH_2PO_4 , 0,5 г NaCl , 41 глюкозы и 50 мл казеинового гидролизата глубокого расщепления pH 7,0. К 9,5 среды добавляли 0,5 л 18-часовой культуры и инкубировали 4 часа при 37° в условиях интенсивной аэрации. Индукцию протеоцина проводили митомицином С из расчета 1 мг/мл. Индуцированную культуру дорастивали еще 2 часа при интенсивной аэрации и оставляли на ночь при 37°. Затем культуральную жидкость осветляли на сепараторной центрифуге при 9000 об/мин в течение 30 мин., а осадок бактерий разрушали на гомогенизаторе при 14 000 об/мин в течение 5—10 мин. для более полного выхода протеоцина, оставшегося в неразрушенных клетках. Суспензию, полученную после гомогенизации, центрифугировали при 6000g и супернатант присоединяли к общему объему осветленной культуральной жидкости. Протеоцин высаливали 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и преципитат собирали центрифугированием при 3000g в течение часа. Осадок ресуспен-

дировали в 0,01 *M* фосфатном буфере рН 7,0, освещали низкоскоростным центрифугированием и центрифугировали при 105 000 *g* в течение 2 час. Осадок суспендировали в том же буфере и суспензию подвергали низкоскоростному центрифугированию. Концентрацию белка определяли по Лоури. Полученный препарат протеоцина использовали как антиген при иммунизации кроликов.

Антисыворотку к протеоцину готовили, иммунизируя кроликов путем введения антигена в краевую ушную вену шестикратно через день в возрастающих количествах (от 5 до 15 мг). Кровь собирали на 9—11 день после последней инъекции в пробирки, покрытые силиконовой смазкой.

Иммунологический комплекс получали путем обработки протеоцина антисывороткой.

Для проведения электронномикроскопического исследования нами были разработаны приемы, которые способствуют получению препаратов комплекса антиген — антитело в максимально дисперсном состоянии и свободных от посторонних белковых примесей. Для получения дисперсного препарата комплекса оба компонента разбавляли 0,5 *M* раствором сахарозы и протеоцин прибавляли к постоянно перемешиваемому раствору антисыворотки из распылителя. Такие условия способствуют образованию индивидуальных частиц комплекса. Очистку целесообразнее проводить после того, как иммунологический комплекс сформировался, так как в процессе очистки отдельных компонентов комплекса происходит значительная потеря материала. Во избежание неспецифической сорбции посторонних белков антисыворотки на формирующийся комплекс, его немедленно переносят в центрифужные пробирки, насливая на 0,5 *M* раствор сахарозы с подслоем из 2 *M* раствора сахарозы. 1-часового центрифугирования при 10 000 *g* было достаточно, чтобы комплекс мягко осел на нижнем слое сахарозы. Для освобождения от сахарозы и для сохранения рыхлого состояния комплекса препарат трехкратно переосаждали в физиологическом растворе кратковременным (до 5 мин.) центрифугированием при 10 000 *g*.

Очищенный комплекс протеоцина с антителами помещали на электронномикроскопические сетки, покрытые угольно-коллодиевой пленкой. Препараты готовили методом негативного контрастирования. В качестве контрастирующего вещества использовали 4% раствор вольфрамовокремневого натрия рН 7. Препараты изучали в электронном микроскопе УЕМ-7 при 80 кВ с увеличением на экране в 50 000 раз.

Как указывалось выше, протеоцин Д52 по структуре подобен отростку Т-четных фагов. В работах (⁸⁻¹⁰) показано, что протеоцин Д52 состоит из чехла, способного к сокращению, внутреннего стержня, базальной пластинки и прикрепленных к ней тонких волокон (рис. 1 А).

Таким образом можно предполагать, что колицин Д52 состоит по крайней мере из четырех различных белков. Изучение белков протеоцина иммунологическим методом в сочетании с электронной микроскопией может способствовать уточнению функциональной роли отдельных элементов фага в процессе взаимодействия его с клеткой-хозяином.

Электронномикроскопическое изучение препаратов комплекса позволило установить, что он по своей структуре резко отличается от исходного антигена. На электронных микрофотографиях (рис. 1Б) четко видно, что протеоцин окутан шубой из антител. Диаметр полученного комплекса равен 360 Å, тогда как диаметр исходной частицы протеоцина равен примерно 200 Å. Периодичность упаковки антител на поверхности протеоцина составляет 35—40 Å. Такое регулярное прикрепление молекул антител указывает на равномерное распределение антигенных детерминант на поверхности протеоцина. Толщина слоя антител, прикрепленных к поверхности протеоцина, составляет 100 Å (рис. 1Б), из чего можно заключить, что длина отдельной молекулы антитела равна также 100 Å. Следует отметить, что этот параметр согласуется с данными Валентайна и Грина (⁴), изучавших размеры и форму молекулы антитела в комплексе с гаптенем.

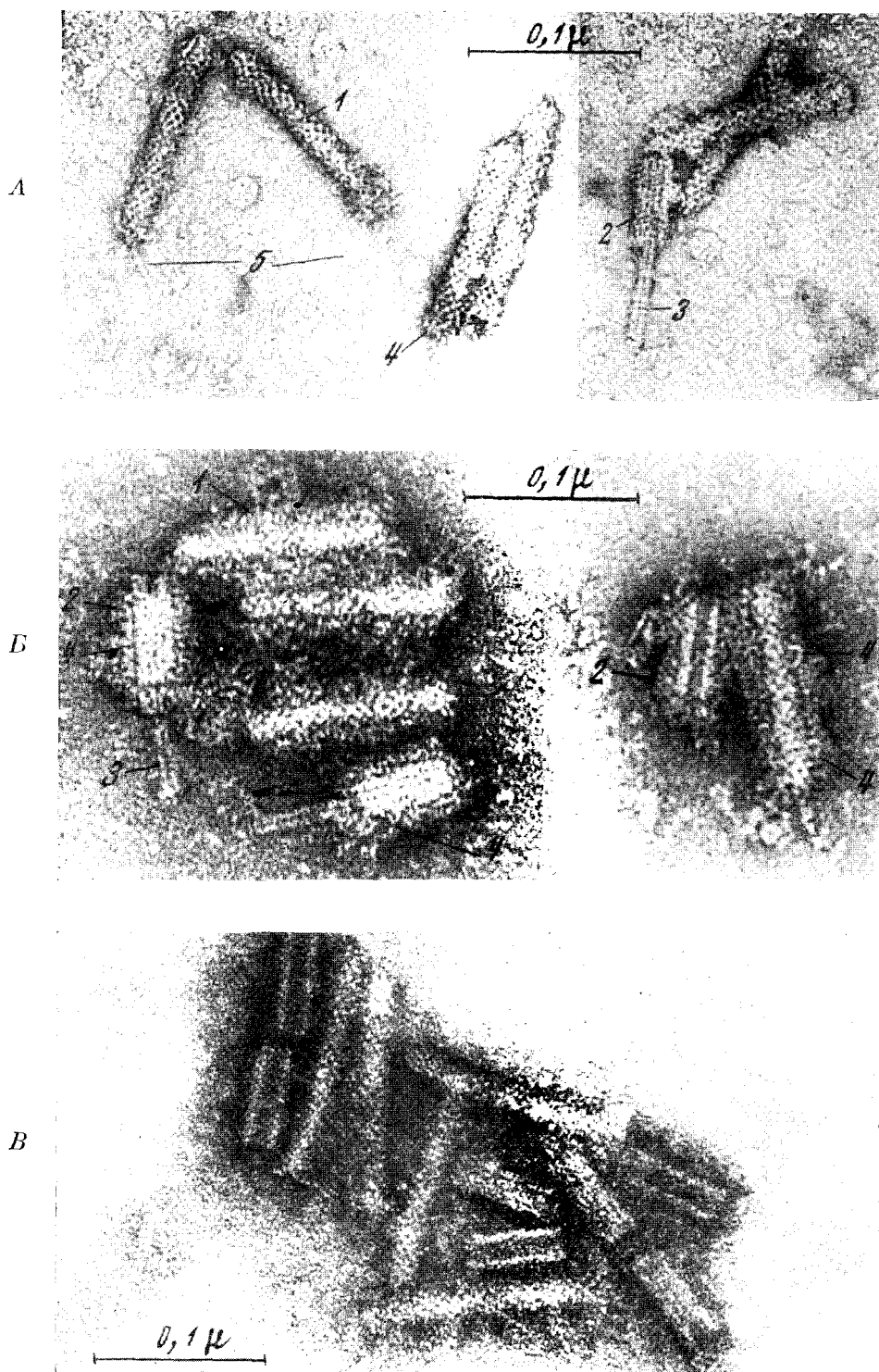


Рис. 1. *А* — протеогии Д52: 1 — интактная частица, 2 — сократившийся чехол, 3 — внутренний стержень, 4 — базальная пластинка, 5 — волокна. *Б* — комплекс протеогии Д52 с антителами: 1 — интактная частица с антителами, 2 — сократившийся чехол с антителами, 3 — внутренний стержень свободный от антител, 4 — антитела в виде дугообразных структур. *В* — протеогии Д52, обработанный антисывороткой, из которой удалены γ G-глобулины; частицы протеогина свободны от антител. Негативное контрастирование 1% уранилацетатом (*А*) и 4% вольфрамвокремневым натрием (*Б, В*)

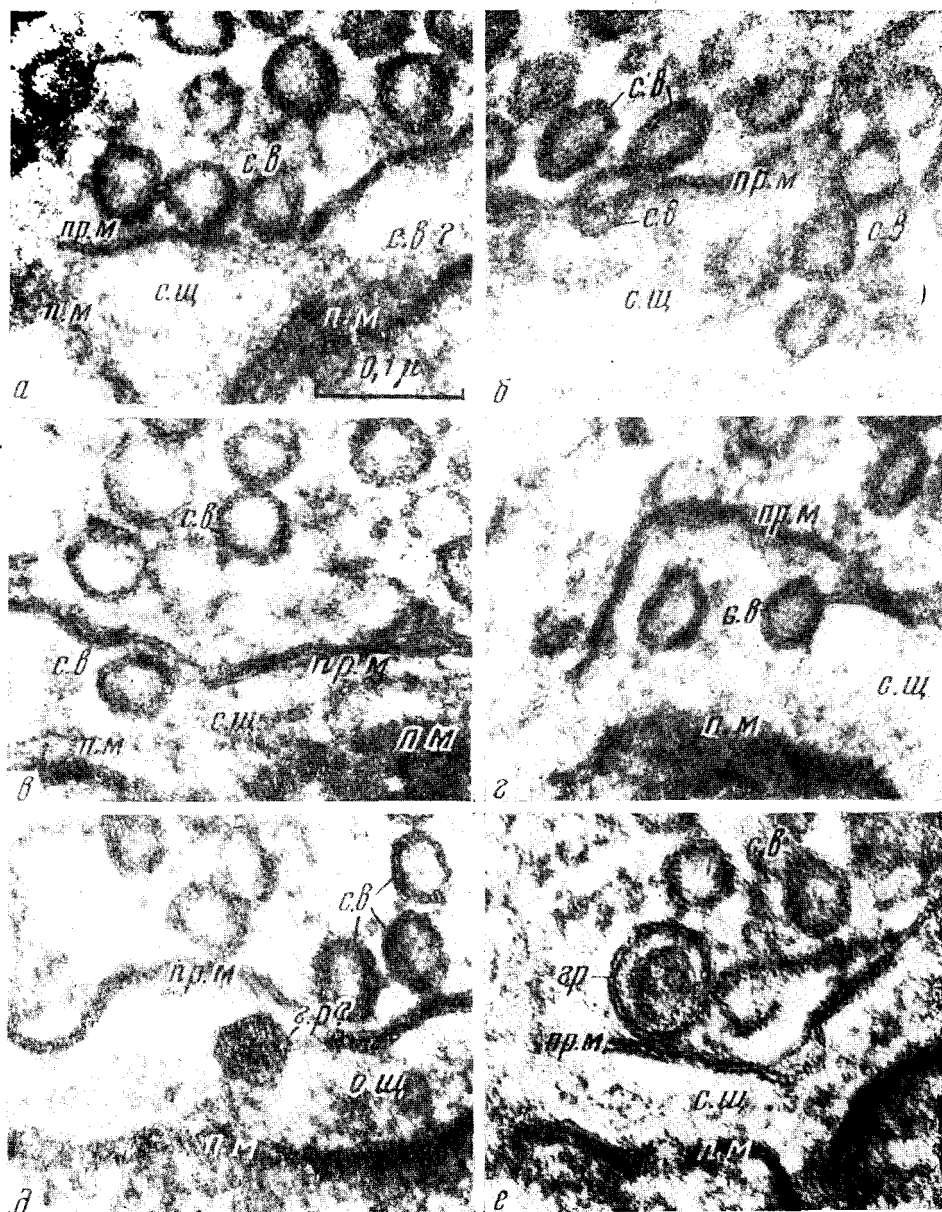


Рис. 1. Различные стадии нейросекреции в нервно-мышечном соединении. Диафрагма крысы предварительно заморожена *in situ*. Префиксация в формол-сахарозе. Фиксация в забуференном растворе четырехокиси осмия. Контрастирование: в кусочке — уранил-ацетатом, в срезах — уранил-ацетатом и цитратом свинца. с.в. — синаптические везикулы, г.р. — гранулярные везикулы, пр.м. — пресинаптическая мембрана, п.м. — постсинаптическая мембрана, с.щ. — синаптическая щель

В ряде случаев на электронных микрофотографиях видны молекулы антител в форме дугообразных структур (рис. 1Б). Из литературных данных (², ³) известно, что такие же структуры наблюдались при электронномикроскопических исследованиях комплексов вирус — антигено. Нам кажется сомнительным, что эти «дуги» представляют собой одну молекулу антитела, как полагают Гото (²) и Лафферти (³). Тогда бы длина молекулы γ G-глобулина была больше 200 Å, что противоречит последним данным физико-химических измерений и электронномикроскопических исследований (⁴⁻⁷). На наш взгляд, дугообразные структуры, по всей вероятности, образуются за счет случайного объединения свободных концов двух соседних молекул антител.

В настоящее время хорошо известно, что в ответ на иммунизацию в антисыворотке помимо γ G-глобулинов образуются и макроглобулины, которые по величине значительно превосходят γ G-глобулины. Для изучения ультраструктуры комплекса необходимо было выяснить, с каким классом иммуноглобулинов мы имеем дело. С этой целью было проведено следующее исследование. Протеоцин Д52 обрабатывали антисывороткой, из которой были удалены γ G-глобулины. γ G-Глобулины удаляли посредством четырехкратной обработки комплексом фиксированного на целлюлозе γ G-глобулина кролика и антител осла против гамма-цепей. При изучении в электронном микроскопе протеоцина Д52, обработанного антисывороткой, истощенной γ G-глобулинами, были обнаружены частицы протеоцина, свободные от молекул антител (рис. 1Б). Из этого можно заключить, что в исходной антисыворотке содержится в основном антитела, относящиеся к классу γ G-глобулинов. Наряду с нативными частицами протеоцина, изредка можно встретить частицы, чехол которых находится в сокращенном состоянии. На электронных микрофотографиях (рис. 1Б) ясно видно, что специфические к протеоцину антитела прикреплены только к поверхности чехла, а стержень, обнажившийся после сокращения чехла, свободен от антител. Отсутствие антител на стержнях частиц с сократившимся чехлом позволяет сделать следующие выводы: во-первых, о высокой степени нативности и гомогенности протеоцина, используемого при иммунизации кроликов; во-вторых, о серологической неидентичности белков чехла и стержня.

Механизм сокращения чехла отростка бактериофагов исследовался рядом авторов (¹¹⁻¹³). В результате сокращения происходит перегруппировка субъединиц, составляющих чехол, которая, вероятно, сопровождается конформационными изменениями в полипептидной цепи. Это может приводить к полной или частичной маскировке антигенных детерминант на поверхности чехла при его сокращении. Однако электронномикроскопическое исследование комплекса протеоцина со специфическими антителами показало, что сокращенный чехол так же взаимодействует со специфическими антителами, как и чехол интактной частицы. На этом основании можно предполагать, что антигенные детерминанты интактного протеоцина в основном остаются на поверхности чехла при его сокращении.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
18 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. D. Almeida, B. Cinader, D. Naylor, J. Exp. Med., **118**, 327 (1963).
- ² S. J. Goto, J. Homma, S. Mudd, J. Bacteriol., **5**, 751 (1967). ³ K. J. Lafferty, S. Oertel, Virology, **21**, 91 (1963). ⁴ E. C. Valentine, N. M. Green, J. Mol. Biol., **27**, 615 (1967). ⁵ M. E. Noelken, C. A. Nelson et al., J. Biol. Chem., **240**, 218 (1965). ⁶ R. S. Nezlin, Y. A. Zagayansky, L. A. Tumerman, J. Mol. Biol., **50**, 569 (1970). ⁷ R. E. Cathou, C. T. O'Konski, J. Mol. Biol., **48**, 125 (1970).
- ⁸ U. Taubenbeck, Zs. Naturforsch., **18**, 989 (1963). ⁹ А. С. Тихоненко, И. А. Беспалова, Н. Н. Беляева, Микробиология, **10**, № 1, 128 (1971). ¹⁰ Г. А. Попова, А. Ф. Кротова, А. С. Тихоненко, Микробиология, **11**, № 3 (1972).
- ¹¹ А. С. Тихоненко, ДАН, **138**, 1449 (1961). ¹² M. E. Moody, J. Mol. Biol., **25**, 167 (1967). ¹³ Н. А. Киселев, Б. Ф. Поглазов, ДАН, **155**, 442 (1964).