

В. М. КУШНАРЕВ, И. Б. МИНЕНКОВА

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО БЕЛКА — ТОКСИНА ИЗ ДИФТЕРИЙНЫХ БАКТЕРИЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 V 1973)

В центре современных исследований о белке стоит изучение пространственной организации молекулы. Однако укладка молекулы пептида в структуру, обладающую биологической активностью, и особенно организация мультимолекулярных комплексов в значительной степени остаются неясными для большинства белков. Получение белков в кристаллическом состоянии позволяет ускорить изучение третичной структуры методом рентгеноструктурного анализа (^{1, 3, 7, 15, 16}), однако применение этого метода связано с большими трудностями и только структура немногих белков изучена этим способом. Непосредственное наблюдение формы и размера молекулы белка в настоящее время возможно только при использовании метода электронной микроскопии (^{1, 17}). Наилучшей техникой для электронной микроскопии белковых молекул является негативное контрастирование, при котором видна не сама молекула, а сильно рассеивающий электроны контрастер (соединение тяжелого металла), проникающий внутрь молекулы и делающий ее видимой (^{1, 17}).

Изучить в электронном микроскопе удалось сравнительно немного белков-ферментов, которые после кристаллизации оказываются доступными исследованию этим методом. Нам известна только одна, к сожалению, неудачная, попытка изучить кристаллизованный бактериальный экзотоксин, причем автору не удалось получить электронномикроскопического изображения кристалла ботулинического экзотоксина из-за препаративных трудностей (⁴).

В настоящей статье приведены данные изучения дифтерийного токсина, кристаллизованного нами по методу Поупа и Стивенс (¹²). Исходным материалом служил ультрафильтрат дифтерийного токсина с содержанием 9600 Лф/мл, любезно предоставленный нам Ю. А. Хавкиным, за что приносим ему большую благодарность. Ультрафильтрат разводили дистиллированной водой до содержания 500 Лф/мл, добавляли 0,5% углекислого натрия и сухой сернокислый аммоний до концентрации 28%. Через сутки созревания при 4° формировался желтоватый осадок, который отфильтровывали и отбрасывали. Затем концентрацию сернокислого аммония доводили до 37%, и через 24–48 час. формировался кристаллический осадок

Рис. 1. Микрофотографии кристаллического белка-токсина. Световая микроскопия (а, б) и электронограммы (в–у). а, б — кристаллы белка дифтерийного токсина, осажденного сернокислым аммонием (а) и фосфорнокислым калием (б), 400×; в — «многослойный» кристалл, 125 000×; г, д — «однослойные» кристаллы: в — 350 000×, г — 800 000×; е — фрагмент рис. 1 а, отпечаток с промежуточного негатива, 3 800 000×, хорошо видны глобулярные субъединицы; ж — кристаллы после инкубирования с $1 \cdot 10^{-5}$ М НАД⁺, 48 час., 600 000×; з — инкубирование 48 час. без НАД (контроль), 150 000×; и — кристаллы, инкубированные со специфическим ферроглобулином, 160 000×. х — большой период, у — малый период, ф — ферроглобулин

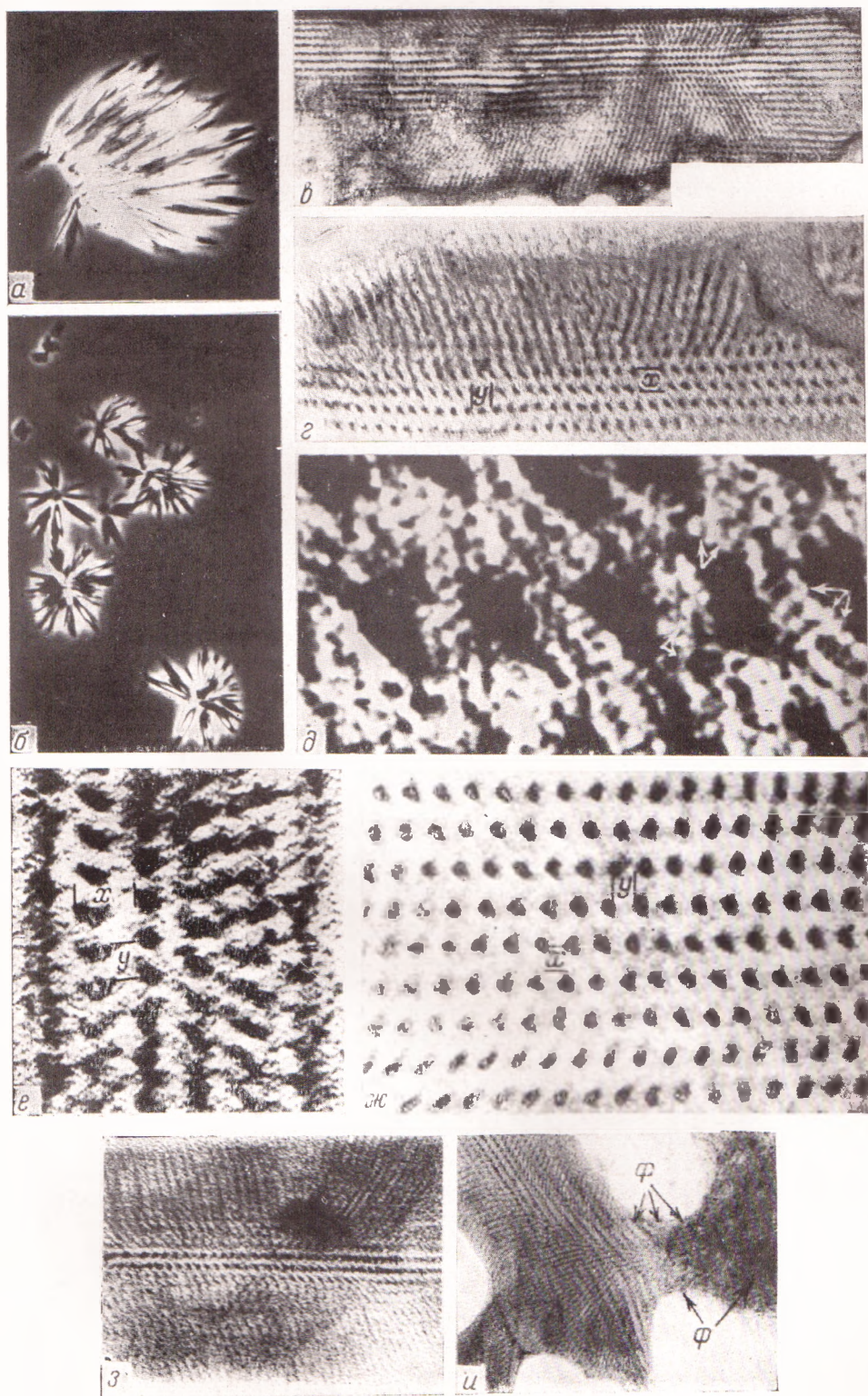


Рис. 1

токсина, который, однако, содержал некоторое количество аморфного материала (рис. 1а). После удаления надосадка центрифугированием при 8000—10 000 об/мин осадок кристаллов растворяли в дистиллированной воде и снова проводили кристаллизацию. Процедуру проводили всего три раза. В отдельной порции кристаллизованного токсина вторую кристаллизацию проводили осаждением фосфорнокислым калием⁽¹²⁾. Кристаллы из этого препарата представлены на рис. 1б. По мере повторностей в надосадке и осадке определяли белок (методом Лоури⁽¹¹⁾) после обессоливания на сефадексе Г-25 или по поглощению при 280 мμ и содержание токсина флоккуляцией со стандартной флоккулирующей сывороткой или чистыми антитоксическими антителами (табл. 1).

Световую микроскопию проводили методом фазового контраста с объективом 20× и окуляром 10×. Фотографировали препараты на микроскопе МБИ-6.

Для электронной микроскопии взвесь кристаллов в маточном растворе наносили на сетку-подложку, покрытую формваровой пленкой, укрепленной углеродом. После отсасывания избытка жидкости наносили каплю контрастера (1% водный раствор уранил-ацетата) и через 10—15 сек. отсасывали фильтровальной бумагой. Просматривали препараты в электронном микроскопе JEM-100-B при рабочем увеличении 30 000—200 000 раз. Чистые антитела конъюгировали с ферритином по методу Синжера и Шика⁽¹¹⁾.

Кристаллы имеют пластинчатую или игольчатую форму и весьма нестойки под лучом электронного микроскопа. На рис. 1 в — е представлены электрограммы кристаллов белка дифтерийного токсина. При значительном наложении слоев друг на друга весьма трудно определить четкую периодичность (рис. 1в). Кроме того, в многослойном кристалле сказывается эффект дислокаций слоев относительно друг друга и отдельных элементарных ячеек в слое⁽²⁾. Поэтому для измерения периодичности выбирали «однослойные» кристаллы (рис. 1г — е), которых было достаточно много в препарате. Данные измерений по двум осям приведены в табл. 2. В кристалле отчетливо представлены два вида периодов, названных нами «малым» и «большим» и расположенных перпендикулярно друг другу (рис. 1 г — е). На рисунке представлены расстояния между элементами решетки по двум осям в «однослойном» кристалле белка-токсина.

Для измерения брали участки кристаллов с наименьшими искажениями в плоскости фотографии. Линейный размер (поперечник) самой белковой структуры, ограниченной с двух сторон контрастером, в «большом» периоде $51,6 \pm 4,1 \text{ \AA}$, а в «малом» периоде $34,4 \pm 1,83 \text{ \AA}$. Эти размеры снимались самостоятельно, а не подсчитывались, как разница величин, данных в табл. 1. Для полной характеристики кристаллической укладки необходимо дать размеры элементарной ячейки по осям и углам между ними с указанием вероятного типа симметрии⁽³⁾. Известно, что необходимым фактором для угнетения белкового синтеза токсином является НАД, который гидролизуетсся дифтерийным токсином^(8, 10). Показано также, что НАД и белок токсина связываются в стехиометрических соотношениях⁽¹³⁾. Поэтому в специальных опытах мы изучили влияние НАД^+ на организацию кристалла белка дифтерийного токсина. К взвеси кристаллов в маточном растворе сернокислого аммония добавили НАД^+ до концентрации $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, и взвесь инкубировали при 37° (контроль — кристаллы токсина без НАД^+). В первые часы в пробирке с НАД^+ появилось много «развалившихся» кристаллов. Через 48 час. большинство оставшихся целыми кристаллов имело отчетливую симметричную укладку (рис. 1 ж, з) с периодом $x \sim 100 \text{ \AA}$ и $y \sim 72 \text{ \AA}$.

На рис. 1ж при большом увеличении представлен участок кристалла, в котором хорошо видно, что изображение структур складывается из шаровидных субъединиц радиусом около $9 \text{ \AA}$. Известно^(8, 9), что молекула состоит из двух неравных частей (полипептид А с м.в. 24 000 и полипеп-

тид В с м. в. 38 000 дальтон). Если принять, что сферическая укладка пептида с радиусом 9 Å имеет м. в. порядка 2000 (16—18 аминокислотных остатков (¹⁸)), то в полипептид А должно входить 12, а в полипептид В — от 18 до 20 таких «клубочков».

Несколько неожиданным оказалось, что с поверхностью хорошо упакованного кристалла не связывается ферроглобулин. Однако на краях кристалла, где его структура не столь плотна, обнаруживаются молекулы фер-

Таблица 1

Содержание белка и результаты флоккуляции кристаллического белка-токсина по мере кристаллизации

Содержание белка и антигенного материала	Исходный токсин	Кристаллизация		
		1	2	3
Азот, мг/мл	5,6	0,149	0,154	0,085
Антиген, Лф/мл	9600	290	410	250
» Лф/мг N	1715	1940	2700	2940

Таблица 2

Размеры элементов кристаллической решетки

Элемент структуры	«Большой» период	Промежуток (контрастер)	«Малый» период	Промежуток (контрастер)
Линейный размер в Å	100,6±3,1	43,5±3,72	67,9±1,8	33,7±1,0
Достоверность средней	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,011$

ритина (рис. 1и). Отсутствие реакции со специфическим антителом может быть результатом экранирования антигенноактивных центров молекулы токсина в кристалле. В пространственной структуре кристалла аминокислотные остатки, обычно находящиеся в гидрофильной фазе, могут оказаться недоступными для антитела или в результате складывания полипептидной цепи, или в результате межмолекулярной агрегации (²). Этот феномен отсутствия реакции кристаллического белка-токсина с антителами мы назвали его серологической инертностью.

Московский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова

Поступило
4 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. А. Киселев, Электронная микроскопия биологических макромолекул, М., 1965.
- ² S. Amelinckx, P. Debavignette, In: Electron Microscopy and Strength of Crystals, 1963, p. 441.
- ³ P. Blow, T. Steitz, Ann. Rev. Biochem., **39**, 63 (1970).
- ⁴ D. Boroff, S. Nyberg, S. Höglund, Infect. and Immunol., **6**, 1003 (1972).
- ⁵ G. Bullen, In: Comprehensive Biochemistry, **3**, M., 1962.
- ⁶ R. Collier, A. Pappenheimer, J. Exp. Med., **120**, 1019 (1964).
- ⁷ D. Davies, Ann. Rev. Biochem., **36**, 1, 321 (1967).
- ⁸ D. Gill, L. Dinius, J. Biol. Chem., **246**, 1485 (1972).
- ⁹ D. Gill, A. Pappenheimer, J. Biol. Chem., **246**, 1492 (1972).
- ¹⁰ D. Gill, A. Pappenheimer et al., J. Exp. Med., **129**, 1 (1969).
- ¹¹ O. H. Lowry et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- ¹² C. Pope, M. Stevens, Brit. J. Exp. Pathol., **39**, 2, 139 (1958).
- ¹³ S. Sperti, L. Montanaro, Biochem. J., **107**, 730 (1968).
- ¹⁴ S. Singer, M. Shick, J. Cell. Biol., **9**, 519 (1961).
- ¹⁵ S. Timasheff, M. Gorbunoff, Ann. Rev. Biochem., **36**, 1 (1967).
- ¹⁶ B. Vainstein et al., In: Microscopie Electronique, **1**, Grenoble, 1970, p. 627.
- ¹⁷ R. Valentine, In: Electron Microscopy, Roma, 1968, p. 3.
- ¹⁸ C. Venkatachalam, G. Ramachandran, Ann. Rev. Biochem., **38**, 45 (1969).