

УДК 576.858.9+539.261

БИОФИЗИКА

А. К. БОЯРИНЦЕВА, А. Т. ДЕМБО, Т. И. ТИХОНЕНКО, Л. А. ФЕЙГИН

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕСА И ГИДРАТАЦИИ БАКТЕРИОФАГА  $C_d$   
ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОВСКОГО МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 18 IV 1973)

К настоящему времени, несмотря на интенсивное изучение бактериофага  $C_d$ , вес фаговой частицы определен еще недостаточно надежно. Молекулярный вес ДНК фага оценивался в  $(66-88) \cdot 10^6$  дальтон, что соответствует весу всей частицы  $(150-200) \cdot 10^6$  дальтон (<sup>1, 2</sup>). Объем сухого нуклеопротеида такого веса составляет примерно  $2 \cdot 10^8 \text{ \AA}^3$  и оказывается почти равным объему нативной фаговой частицы (<sup>3</sup>), не оставляя места для гидратационной воды. Это побудило нас независимо определить вес фаговой частицы  $C_d$ .

Определение веса фаговых частиц относится к одной из наиболее сложных задач физико-химического исследования вирусов. Это связано главным образом с их большими размерами. Поэтому использование равновесного центрифугирования и других седиментационных методов наталкивается на значительные экспериментальные трудности, хотя на этом пути в последнее время получен ряд надежных значений весов фагов (<sup>4-6</sup>). Электронная микроскопия также дает определенные возможности (<sup>7</sup>).

В настоящей работе определен вес фаговой частицы  $C_d$  с помощью рентгеновского исследования разбавленных суспензий фага. Фаг  $C_d$  был выращен на *Escherichia coli* СК и очищен по известным методикам (<sup>8</sup>). Фаговые препараты дополнительно очищались градиентным центрифугированием в хлористом пезии и диализовались против буфера pH 7,0-7,5 ( $0,15 M$  NaCl с добавками  $0,05 M$  цитрата Na или  $0,05 M$  трис-HCl). На седиментограммах, полученных на ультрацентрифуге Спинко Е, препараты обнаруживали один резкий пик.

Интенсивность рентгеновского малоуглового рассеяния измерялась на камере системы Кратки. Использовалась рентгеновская трубка BCB-11 с медным анодом. Импульсы регистрировались сцинтилляционным счетчиком с амплитудным дискриминатором. Автоматизация измерений осуществлена благодаря применению программного сканирующего устройства. Образец помещался в кювету из нержавеющей стали со слюдяными окнами, расстояние между которыми составляло 0,995 мм. Кривые рассеяния снимались при температуре 12°. Для каждого угла рассеяния набиралось  $3 \cdot 10^4 - 10^5$  имп. Концентрация фага в исследуемых образцах была от 1 до 13 мг/мл. Измерялось также рассеяние буфером, которое вычиталось из рассеяния образцом. Кривые сглаживались вручную и вводилась коллимационная поправка на ЭВМ (<sup>9</sup>).

Измерение рентгеновского малоуглового рассеяния в абсолютной шкале интенсивности позволяет определять молекулярный вес макромолекул (<sup>10, 11</sup>). Расчет веса частицы  $P$  проводится по формуле

$$P = \frac{i(0)}{W_0} \frac{R^2}{r_0^2 \mu_{\text{эфф}}^2 N^2 \Delta C b_r}, \quad (1)$$

где  $i(0)$  — экстраполированное к нулевому углу и бесконечному разведению значение интенсивности рассеяния,  $W_0$  — интенсивность первичного пучка,  $r_0$  — томсоновский радиус электрона,  $N$  — число Авогадро,  $C$  — весовая концентрация бактериофага в растворе,  $\Delta$  — толщина образца,

$b_r$  — ширина приемной щели детектора рентгеновских лучей,  $\mu_{\text{эфф}}$  — эффективное число электронов на единицу молекулярного веса,  $R$  — расстояние от образца до приемника рентгеновских лучей. Следует отметить, что  $P$  в формуле (1) относится к негидратированной частице. Применение этого метода для «взвешивания» неоднородных по химическому составу биологических макромолекул связано с определенными трудностями, на которых мы остановимся ниже.

Помимо универсальных коэффициентов и геометрических параметров прибора нужно определить  $i(0) / W_0$ , т. е. интенсивность малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в абсолютной шкале, концентрацию  $C$  и  $\mu_{\text{эфф}}$ .

Рассмотрим кривые рассеяния бактериофагом  $C_d$ , полученные при измерении фаговых супензий различных концентраций (рис. 1). Препараты различной концентрации, полученные из исходного (1), соответствуют разведению в 2 и 4 раза. По этим кривым удалось построить экстраполированную к бесконечному разведению интенсивность рассеяния  $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$ ,  $\theta$  — половина угла рассеяния,  $\lambda$  — длина волны рентгеновского излучения.

По кривой 4 нами найдено значение  $i(0)$  — интенсивность рассеяния в направлении первичного пучка. Заметим, что экстраполяция к бесконечному разведению не требует знания абсолютной величины концентрации.

Рис. 1. Интенсивности рентгеновского малоуглового рассеяния супензиями бактериофага  $C_d$  различной концентрации: 1 — 9,8, 2 — 4,9  $C$ , 3 — 24,5 мг/мл, 4 —  $\lg i(s^2)C$ . Экстраполированная к бесконечному разведению интенсивность рассеяния  $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$ ,  $\theta$  — половина угла рассеяния,  $\lambda$  — длина волны рентгеновского излучения

Положение к бесконечному разведению не требует знания абсолютной величины концентрации.

Приведение  $i(0)$  к абсолютной шкале интенсивности проводилось национальным двумя способами — по эталонному образцу, переданному нам профессором Кратки (Грац, Австрия) и по оригинальной методике, описанной в (12). Расхождение результатов, полученных этими двумя методами, не превышает 3%.

Определение весовой концентрации фаговых частиц в супензиях проводилось следующим образом: определялось содержание фосфора (13), по фосфору находилось содержание ДНК, а затем рассчитывалась концентрация фага, исходя из содержания ДНК в фаге, равного 43,5% (14).

При определении молекулярного веса рентгеновским методом основную ошибку, по-видимому, вносит неточное определение  $\mu_{\text{эфф}}$ , так как в формулу (1) входит  $\mu_{\text{эфф}}^2$ . Рассмотрим выражение для  $\mu_{\text{эфф}}$ :

$$\mu_{\text{эфф}} = \frac{A}{M} - \frac{A_s}{M_s} d_s \bar{v}, \quad (2)$$

где  $A / M = \mu$ ,  $A_s / M_s = \mu_s$  — число электронов на единицу молекулярного веса исследуемой частицы и растворителя соответственно,  $d_s$  — плотность растворителя,  $\bar{v}$  — удельный парциальный объем частицы.

Рассмотрим входящие сюда величины:  $A / M$  определяется химическим составом и для ДНК мало зависит от первичной структуры (% ГЦ-пар). Расчет показывает, что для любой ДНК с точностью до 0,1% можно принять  $\mu_{\text{ДНК}} = 0,518$ . В случае белков  $\mu$  колеблется тоже незначительно и в среднем равно 0,535. Тогда  $\mu$  фага  $C_d$  равно 0,528 электрон / дальтон. Для воды  $\mu$  равно 0,555. Для применявшихся буферов величина  $\mu_s$  отличается от  $\mu_{\text{H}_2\text{O}}$  пренебрежимо мало.

Для нахождения удельного парциального объема  $\bar{v}$ , необходимого для расчета  $\mu_{\text{эфф}}$  по формуле (2), мы применили два подхода: теоретический расчет, основанный на знании химического состава фага  $C_d$  — соотношение между ДНК и белковой компонентой, и непосредственное экспериментальное определение  $\bar{v}$ , основанное на измерении плотности фаговой суспензии и чистого растворителя по методике <sup>(15)</sup>. Расчет дал значение 0,670 см<sup>3</sup>/г, эксперимент 0,669 см<sup>3</sup>/г \*. Таким образом,  $\mu_{\text{эфф}}$  для фага  $C_d$  равно 0,155 электрон/дальтон,  $\mu_{\text{эфф}}^2 = 0,024$ .

Исходя из всех полученных численных значений, мы смогли рассчитать значение веса частицы  $P$ , оказавшееся равным  $(1,80 \pm 0,2) \cdot 10^{-16}$  г, что соответствует «молекулярному» весу  $(110 \pm 10) \cdot 10^6$  дальтон.

Зная вес «сухой» фаговой частицы, удельный парциальный объем и объем гидратированной частицы (рассчитанный <sup>(3)</sup> нами по рентгеновским данным), мы можем оценить гидратацию фага  $C_d$ . Объем гидратированной частицы  $2,2 \cdot 10^8$  Å<sup>3</sup>, объем, приходящийся на «сухой» фаг, равен  $1,2 \cdot 10^8$  Å<sup>3</sup>. Таким образом, вода в частице занимает объем  $1 \cdot 10^8$  Å<sup>3</sup>, т. е. ~40%. Отсюда гидратация фага  $C_d$  равна 0,5–0,6 г воды на 1 г сухого вируса, а степень набухания (отношение объема частицы к объему «сухого» вещества) равна примерно 1,8. Геометрические и весовые параметры бактериофага  $C_d$  следующие.

Ребро октаэдра, $a$	780 Å
Объем, $V$	$2,2 \cdot 10^8$ Å <sup>3</sup>
Вес негидратированной частицы, $P$	$1,8 \cdot 10^{-16}$ г
«Молекулярный вес» негидратированной частицы, $M$	$110 \cdot 10^6$
Удельный парциальный объем, $v$	0,670 см <sup>3</sup> /г
Объем негидратированной частицы, $V_d$	$1,2 \cdot 10^8$ Å <sup>3</sup>
Объем воды в частице, $V_h$	$1 \cdot 10^8$ Å <sup>3</sup>
Вес воды в частице, $P_h$	$1 \cdot 10^{-16}$ г
Гидратация фага	0,5–0,6 г H <sub>2</sub> O/г сухого фага
Степень набухания, $q = V/V_d$	1,8
Средняя плотность гидратированной частицы, $d$	1,27 г/см <sup>3</sup>

По найденным значениям веса и гидратации фаговой частицы  $C_d$  и из геометрических параметров, определенных нами ранее <sup>(3)</sup>, была рассчитана средняя плотность гидратированной частицы 1,27 г/см<sup>3</sup>.

Таким образом, проведенные измерения рентгеновского малоуглового рассеяния в абсолютной шкале интенсивности позволили надежно определить численные параметры размера, формы, веса и гидратации бактериофага  $C_d$ .

Авторы благодарят Н. А. Симукову за помощь при определении содержания ДНК в фаговых суспензиях и Б. К. Вайнштейна за обсуждение результатов.

Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова  
Академии наук СССР

Поступило  
15 IV 1973

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Н. А. Киселев, Т. И. Тихоненко и др., Биохимия, 28, 1065 (1963).
- 2 Т. И. Тихоненко, Биохимия вирусов, М., 1966, стр. 142.
- 3 А. К. Бояринцева, А. Т. Дембо и др., ДАН, 209, № 3 (1973).
- 4 F. C. Bancroft, D. Freifelder, J. Mol. Biol., 54, 537 (1970).
- 5 S. B. Dubin, G. B. Benedek, J. Mol. Biol., 54, 547 (1970).
- 6 D. Freifelder, J. Mol. Biol., 54, 567 (1970).
- 7 D. Lang, J. Mol. Biol., 54, 557 (1970).
- 8 Т. И. Тихоненко, Н. Я. Соловьева, Биохимия, 26, 794 (1961).
- 9 Б. М. Щедрин, Л. А. Фейгин, Кристаллография, 11, 159 (1966).
- 10 О. Краткы, Zs. anal. Chem., 201, 161 (1964).
- 11 Л. А. Фейгин, Кристаллография, 12, 274 (1967).
- 12 Н. И. Сосенов, Л. А. Фейгин, Аппаратура и методы рентгеноструктурного анализа, 7, 15 (1971).
- 13 E. Gerlach, B. Deitrich, Biochem. Zs., 337, 447 (1963).
- 14 Т. И. Тихоненко, Г. А. Великодворская, Э. В. Земцова, Биохимия, 27, 726 (1962).
- 15 О. Краткы, H. Leopold, H. Stabinger, Zs. angew. Phys., 27, № 4, 273 (1969).

\* Данное измерение проведено Р. Обертуром (кафедра физической химии Университета г. Майнца, ФРГ), за что авторы выражают ему свою признательность.