

УДК 576.858.9+539.261

БЕОФИЗИКА

А. К. БОЯРИНЦЕВА, А. Т. ДЕМБОВ, Т. П. ТИХОНЕНКО, Л. А. ФЕЙГИН

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕСА И ГИДРАТАЦИИ БАКТЕРИОФАГА S_d ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОВСКОГО МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ*(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 18 IV 1973)*

К настоящему времени, несмотря на интенсивное изучение бактериофага S_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^(1, 2). Объем сухого нуклеопротеида такого веса составляет примерно $2 \cdot 10^8 \text{ \AA}^3$ и оказывается почти равным объему нативной фаговой частицы⁽³⁾, не оставляя места для гидратационной воды. Это побудило нас независимо определить вес фаговой частицы S_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⁽⁴⁻⁶⁾. Электронная микроскопия также дает определенные возможности⁽⁷⁾.

В настоящей работе определен вес фаговой частицы S_d с помощью рентгеновского исследования разбавленных суспензий фага. Фаг S_d был выращен на *Escherichia coli* СК и очищен по известным методикам⁽⁸⁾. Фаговые препараты дополнительно очищались градиентным центрифугированием в хлористом цезии и дилизались 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 БСВ-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⁽⁹⁾.

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

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

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, Δ — толщина образца,

b_r — ширина приемной щели детектора рентгеновских лучей, $\mu_{эфф}$ — 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.

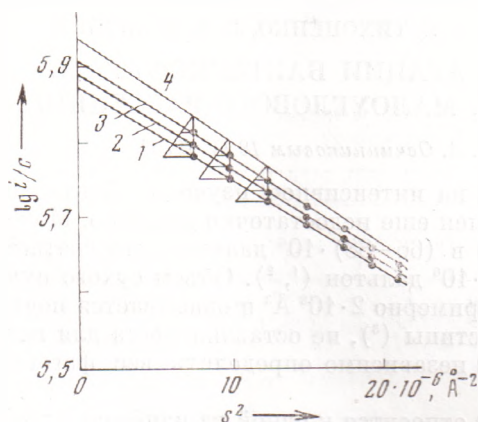


Рис. 1. Интенсивности рентгеновского малолугового рассеяния суспензиями бактериофага S_d различной концентрации: 1 — 9,8, 2 — 4,9 C , 3 — 24,5 мг/мл, 4 — $\lg i(s^2)C$. Экстраполированная к бесконечному разведению интенсивность рассеяния $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$, θ — половина угла рассеяния,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

поляция к бесконечному разведению не требует знания абсолютной величины концентрации.

Приведение $i(0)$ к абсолютной шкале интенсивности проводилось нами 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 суспензиях 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 $\mu_{эфф}$, так как в формулу (1) входит $\mu_{эфф}^2$. Рассмотрим выражение для $\mu_{эфф}$:

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

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 $\mu_{ДНК} = 0,518$. В случае белков μ колеблется тоже незначительно и в среднем равно 0,535. Тогда μ фага S_d равно 0,528 электрон/дальтон. Для воды μ равно 0,555. Для применявшихся буферов величина μ , отличается от μ_{H_2O} пренебрежимо мало.

Для нахождения удельного парциального объема \bar{v} , необходимого для расчета $\mu_{эфф}$ по формуле (2), мы применили два подхода: теоретический расчет, основанный на знании химического состава фага C_d — соотношения между ДНК и белковой компонентой, и непосредственное экспериментальное определение \bar{v} , основанное на измерении плотности фаговой суспензии и чистого растворителя по методике (¹⁵). Расчет дал значение 0,670 см³/г, эксперимент 0,669 см³/г *. Таким образом, $\mu_{эфф}$ для фага C_d равно 0,155 электрон/дальтон, $\mu_{эфф}^2 = 0,024$.

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 (³) нами по рентгеновским данным), мы можем оценить гидратацию фага C_d . Объем гидратированной частицы $2,2 \cdot 10^8$ Å³, объем, приходящийся на «сухой» фаг, равен $1,2 \cdot 10^8$ Å³. Таким образом, вода в частице занимает объем $1 \cdot 10^8$ Å³, 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 ³
Вес негидратированной частицы, P	$1,8 \cdot 10^{-16}$ г
«Молекулярный вес» негидратированной частицы, M	$110 \cdot 10^6$
Удельный парциальный объем, \bar{v}	0,670 см ³ /г
Объем негидратированной частицы, V_d	$1,2 \cdot 10^8$ Å ³
Объем воды в частице, V_h	$1 \cdot 10^8$ Å ³
Вес воды в частице, P_h	$1 \cdot 10^{-16}$ г
Гидратация фага	0,5–0,6 г H ₂ O/г сухого фага
Степень набухания, $q = V/V_d$	1,8
Средняя плотность гидратированной частицы, d	1,27 г/см ³

По найденным значениям веса и гидратации фаговой частицы C_d и из геометрических параметров, определенных нами ранее (³), была рассчитана средняя плотность гидратированной частицы 1,27 г/см³.

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. Симукону 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. Иванова
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. Щедрип, Л. А. Фейгин, Кристаллография, 11, 159 (1966).
- ¹⁰ O. Kratky, Zs. anal. Chem., 201, 161 (1964).
- ¹¹ Л. А. Фейгин, Кристаллография, 12, 274 (1967).
- ¹² Н. И. Сосфенов, Л. А. Фейгин, Аппаратура и методы рентгеноструктурного анализа, 7, 15 (1971).
- ¹³ E. Gerlach, B. Deuticke, Biochem. Zs., 337, 447 (1963).
- ¹⁴ Т. И. Тихоненко, Г. А. Великодворская, Э. В. Земцова, Биохимия, 27, 726 (1962).
- ¹⁵ O. Kratky, H. Leopold, H. Stabinger, Zs. angew. Phys., 27, № 4, 273 (1969).

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