

Т. Н. ЕВРЕИНОВА, А. Ф. ОРЛОВСКИЙ, академик А. И. ОПАРИН

ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТА ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗЫ В БЕЛКОВОУГЛЕВОДНОЙ КОАЦЕРВАТНОЙ СИСТЕМЕ

Коацерватные капли можно рассматривать как одну из предклеточных моделей. По теории академика А. И. Опарина объединение веществ в водах первичного океана могло происходить в форме коацерватных капель⁽³⁾. Коацерватные системы получают из самых разнообразных полимерных соединений, таких как белки, нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды, полисахариды и др. В коацерватных каплях концентрируются различные вещества^(1, 2). Каталитические реакции, протекающие в коацерватных каплях, превращают их в открытые системы. Наиболее активными и специфическими катализаторами являются ферменты. Изучение действия ферментов в коацерватных системах представляют существенный интерес для моделирования в них первичных форм обмена веществ, эволюция которого могла привести к возникновению пробионтов⁽⁴⁾. Целью данного исследования является выяснение возможности синтетического действия полинуклеотидфосфорилазы (2.7.7.8) в белковоуглеводной коацерватной системе при pH 8,1. Как правило, оптимум активности препаратов полинуклеотидфосфорилазы находится при pH 9,0. Такая pH сильно отличается от физиологического значения.

Для получения коацерватной системы взяты: гистон, содержащий 16% азота, полученный Т. В. Мамонтовой из зобной железы телят по методу Хнилица⁽⁶⁾, гуммиарабик фирмы «Merck», натриевая соль АДФ фирмы «Reanal» и два препарата полинуклеотидфосфорилазы, один из которых получен из *Azotobacter vinelandii* по методу Грюнберг-Манаго и Очоа⁽⁵⁾, второй из *Escherichia coli*, и любезно предоставлен нам Грюнберг-Манаго*. За единицу удельной активности полинуклеотидфосфорилазы принято считать включение 1 мкмоль АДФ и поли-А на 1 мг препарата белка за 30 мин. при 37°^(5, 7). Фермент из *Azotobacter vinelandii* имел 8 единиц активности, а из *Escherichia coli* 14,4.

Состав коацерватной системы. Белковоуглеводная система (гистон — гуммиарабик) с ферментом полинуклеотидфосфорилазой (в мл): 0,02 буфера (1,5 M трис-HCl + 0,01 M версен) pH 8,0; 0,01 полинуклеотидфосфорилазы 0,25%; 0,2 гуммиарабика 0,67%; 0,2 гистона 1%; 0,25 АДФ 2,1% в буферном растворе при pH 8,0; 0,025 MgCl₂ 2% и до 1 мл дистиллированной воды. Синтез вели при 37° в течение 15, 30, 60 мин. Определение активности фермента проводили во всей коацерватной системе, во фракции коацерватных капель и во фракции равновесной жидкости, а также проводили контрольное определение, в котором вместо гуммиарабика (и гистона) была взята дистиллированная вода в том же объеме. Кроме того определяли распределение фермента в коацерватной системе следующим путем⁽²⁾. Приготавливали 2 коацерватные системы: 1) коацерватную систему с ферментом; 2) коацерватную систему без фермента, где раствор фермента заменялся на H₂O. Затем с помощью центрифугирования при 3000 об/мин каждая система отдельно разделялась на фракции равновесной жидкости и коацерватных капель. После этого к фракции коацерватных

* Авторы приносят глубокую благодарность доктору Тангу за предоставление препарата фермента *E. coli*.

капель коацерватной системы 1 с ферментом добавляли равновесную жидкость коацерватной системы 2 без фермента, а к каплям системы 2 добавляли равновесную жидкость от коацерватной системы с ферментом.

Количество синтезированной поли-А во всех указанных случаях определяли следующим образом: по окончании инкубирования прекращали ферментную реакцию, добавляя 2,5 N HClO₄ до конечной концентрации HClO₄ в смеси до 0,5 N. В этом случае происходило также осаждение полиадениловой кислоты. Осадок поли-А отмывали от АДФ 0,5 N HClO₄ на мембранном фильтре «Сынпор» с диаметром отверстий 0,23 мкм. Затем осадок гидролизовали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. до АДФ. Гидролизат охлаждали и измеряли содержание АДФ по поглощенную ультрафиолетового излучения с длиной волны 260 нм в спектрофотометре СФ-4А.

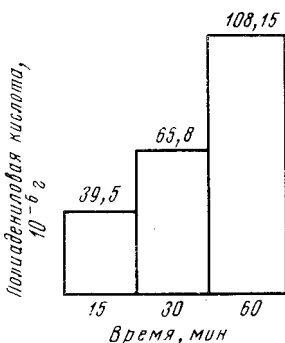


Рис. 1. Синтез полиадениловой кислоты в коацерватной системе полинуклеотидфосфорил азы — АДФ — гистон — туммиарабик (рН 8,1). Фракция коацерватных капель

канадским бальзамом. Такой препарат-микрокамеру ставили на нагревательный столик микроскопа при 37°, просматривали с объективом 40X·0,65 и окуляром 8X и фотографировали через определенные промежутки времени.

Результаты исследования показали: фермент концентрируется в каплях и практически отсутствует в равновесной жидкости. Как следует из рис. 1, количество полиадениловой кислоты с увеличением времени синтеза возрастает. Синтез поли-А сопровождается увеличением размеров индивидуальных капель. В качестве примера в табл. 1 приведена часть результатов по изменению размеров капель при синтезе в них поли-А с участием полинуклеотидфосфорилаз. На рис. 2 представлены фотографии одной и той же капли во время синтеза в ней полиадениловой кислоты в микрокамере. Кроме того в коацерватной системе наблюдается новообразование капель, как правило, в тесном контакте с уже имеющейся каплей,

Таблица 1

Изменение размеров капель при синтезе полиадениловой кислоты в коацерватной системе полинуклеотидфосфорилаза — АДФ — гистон — туммиарабик (рН 8,1; 37°)

№ капли	Время синтеза, мин.	Диаметр, 10 ⁻⁴ см	Объем, 10 ⁻¹² см	№ капли	Время синтеза, мин.	Диаметр, 10 ⁻⁴ см	Объем, 10 ⁻¹² см
Фермент из <i>Azotobacter vinelandii</i>				Фермент из <i>Escherichia coli</i>			
1	15	2,63	9,5	4	10	2,97	13,7
	30	2,67	10,0		25	3,02	14,4
	120	2,87	13,5		120	3,23	17,6
2	15	3,27	18,2	5	10	3,18	16,8
	30	3,33	19,9		25	3,20	17,1
	120	3,69	24,4		120	3,66	25,6
3	15	3,53	23,0	6	10	4,0	33,5
	30	3,66	25,6		25	4,35	43,1
	120	3,80	38,7		120	4,60	51,0

Капли образуют колонии и являются более устойчивыми, чем коацерватные капли, состоящие из гистона и гуммиарабика.

Коацерватная система в отличие от буферных растворов является гетерогенной системой и состоит из 2 фаз. Одна фаза представлена коацерватными каплями, а вторая фаза — равновесной жидкостью. Фермент сконцентрирован в каплях, а его субстрат АДФ присутствует в каплях и в

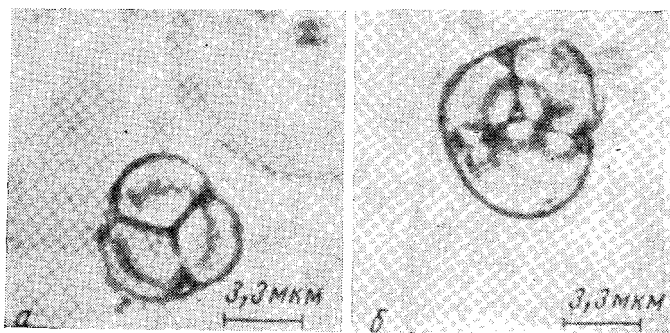


Рис. 2. Изменение коацерватной капли во время синтеза полиадениловой кислоты в коацерватной системе полинуклеотидфосфорилаза — АДФ — гистон — гуммиарабик (рН 8,1; 37°).
а — время синтеза 2 мин., б — 30 мин.

равновесной жидкости. По мере синтеза поли-А в каплях потребляется АДФ капель, а затем в капли поступает АДФ из равновесной жидкости. Таким образом в каплях осуществляется направленный синтез полиадениловой кислоты.

Авторы приносят глубокую благодарность проф. Парижского института физико-химической биологии М. Грюнберг-Манаго за предоставление препарата фермента из *E. coli*, Т. В. Мамоновой за полученный от нее препарат белка гистона, К. Л. Гладилину, В. Я. Бухлаевой за помощь в работе.

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

Поступило
11 X 1974

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. П. Евреинова, Концентрирование веществ и действие ферментов в коацерватах, «Наука», 1966. ² Т. П. Евреинова, В сб.: Эволюционная биохимия, М., 1973, стр. 12. ³ А. И. Опарин, Жизнь, ее природа и происхождение, «Наука», 1968. ⁴ А. И. Опарин, В сб.: Эволюционная биохимия, М., 1973, стр. 1. ⁵ М. Грюнберг-Манаго, В сб.: Нуклеиновые кислоты, М., 1965, стр. 112. ⁶ L. Hnilica, S. Nypra, Biologia, Bratislava, v. 14, 821 (1959). ⁷ Th. Godefroy-Colburn, M. Grunberg-Manago, In: The Enzymes, London, 1972, p. 533.