

Т. В. МАМОНТОВА, Т. Н. ЕВРЕЙНОВА, Ю. Р. ХРУСТ

**ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТОВ
ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ОТ РАЗМЕРОВ
КОАЦЕРВАТНЫХ КАПЕЛЬ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 25 XII 1974)

Коацерватные капли, согласно теории «Происхождения жизни» академика А. И. Опарина, рассматриваются как предклеточные модели ⁽⁵⁾. Включение ферментов в коацерватные системы позволяет воспроизвести те возможные химические процессы, которые могли привести к формированию структуры и обмена веществ у примитивных предклеточных форм.

Для всех известных до сих пор систем характерны неустойчивые коацерватные капли: они сливались, образуя сплошной слой. Первая устойчивая белково-углеводная коацерватная система получена в 1968 году в результате моделирования в ней ферментативной реакции окисления феполов в хиноны ⁽¹⁾. Впоследствии в коацерватных системах были осуществлены различные ферментативные реакции с участием окислительных ферментов: полифенолоксидазы (1.10.3.1) и пероксидазы (1.11.1.7). В таких системах коацерватные капли, стабилизированные продуктами ферментативного окисления, не разрушались и сохраняли свою индивидуальную структуру в течение длительного времени — до 4 лет и дольше ^(4, 7).

Целью работы являлось количественное измерение стабилизирующих продуктов окисления в индивидуальных коацерватных каплях, а также установление зависимости между размером капель и содержанием в них окисленных соединений.

Объектами исследования служили белково-углеводные коацерватные системы, состоящие из гистона и гуммиарабика, и белково-нуклеиновые коацерватные системы, состоящие из гистона и ДНК. Детали приготовления коацерватных систем опубликованы ранее ^(2, 4). В этих системах были моделированы ферментативные реакции окисления пирогаллола и *o*-дианизидина пероксидазой в присутствии H₂O₂. Образующиеся продукты ферментативного окисления — пурпурогаллин и окисленный *o*-дианизидин (4,4'-диимино — 3,3'-диметоксибифенил) концентрировались в каплях, их окрашивали в желто-коричневый цвет и придавали им значительную устойчивость. Количественные измерения окисленных соединений в индивидуальных стабилизированных коацерватных каплях проводили оптическими методами. Для этой цели использовали зондовый цитоспектрофотометр МУФ-5 и экспериментальную установку — сканирующий интегрирующий микрофотометр СИМ-1 ^(3, 6). С помощью цитоспектрофотометра МУФ-5 были сняты абсорбционные спектры белково-углеводных и белково-нуклеиновых коацерватных систем, содержащих продукты ферментативного окисления.

На основе абсорбционных спектров установлено, что пурпурогаллин, сконцентрированный в каплях, имеет максимум поглощения света в области $\lambda=415-420$ нм, а максимум поглощения света окисленным *o*-дианизидином находится в области $\lambda=435-440$ нм. Количественные измерения окисленных соединений проводили на микрофотометре СИМ-1. Этот прибор позволял быстро и с высокой точностью определить

по оптической плотности количество вещества в капле и ее размеры. Оптическую плотность измеряли при определенной длине волны, соответствующей максимуму поглощения света продуктами ферментативного окисления. Ошибка не превышала 3%.

В результате многочисленных измерений показано, что с увеличением размеров коацерватных капель, содержание в них окисленных веществ возрастает, а концентрация снижается (², ⁴). На основе обработки полученных экспериментальных данных методами математической статистики были выведены уравнения, выражающие зависимость содержания и кон-

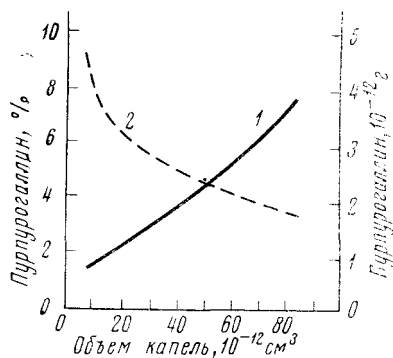


Рис. 1. Зависимость содержания в граммах (1) и в процентах (2) пурпурогаллина от размеров коацерватных капель системы пероксидаза — пирогаллол — ДНК — гистон — пурпурогаллин (рН 6,0)

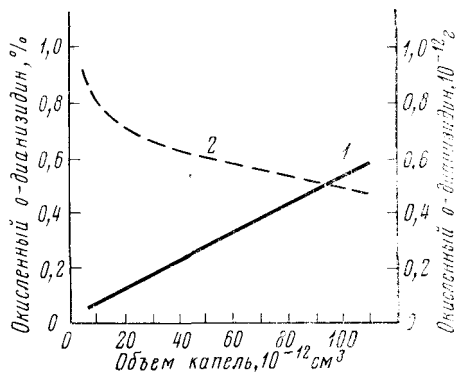


Рис. 2. Зависимость содержания в граммах (1) и в процентах (2) окисленного *о*-дианизидина от размеров коацерватных капель системы пероксидаза — *о*-дианизидин — гуммиарабик — гистон — окисленный *о*-дианизидин (рН 6,0)

центрации продуктов ферментативного окисления от размеров коацерватных капель. Так, для коацерватной системы пероксидаза — пирогаллол — ДНК — гистон — пурпурогаллин зависимость между размерами капель (x) и содержанием в них пурпурогаллина (y) была описана следующим уравнением параболы:

$$y = 0,634 + 0,023x + 0,0002x^2,$$

где y — количество пурпурогаллина, 10^{-12} г; x — объем коацерватной капли, 10^{-12} см³.

Графическое изображение установленной зависимости представлено на рис. 1, 1.

Установлено, что между концентрацией пурпурогаллина (y') и размерами белково-нуклеиновых коацерватных капель (x) существует гиперболическая зависимость (рис. 1, 2), которая была описана уравнением следующего вида:

$$y' = 5,509 - 0,025x + 29,142/x,$$

где y' — концентрация пурпурогаллина, %; x — объем коацерватной капли, 10^{-12} см³.

Увеличение содержания окисленного *о*-дианизидина в коацерватных каплях системы пероксидаза — *о*-дианизидин — гуммиарабик — гистон — окисленный *о*-дианизидин при возрастании их размеров также подчиняется параболической зависимости, которая выражена следующим уравнением:

$$y = 0,054 + 0,005x - 0,0000005x^2,$$

где y — количество окисленного *о*-дианизидина, 10^{-12} г; x — объем коацерватной капли, 10^{-12} см³.

Кривая 1 рис. 2, получена по этому уравнению. Зависимость концентрации окисленного *о*-дианизидина от размеров белково-углеводных коацер-

Содержание продуктов ферментативного окисления в коацерватных каплях разных систем

№ капли	Диаметр, 10 ⁻⁴ см	Объем, 10 ⁻¹² см ³	Гуммиара- бик—гис- тон, 10 ⁻¹² г	ДНК — гис- тон, 10 ⁻¹² г	Гуммиара- бик — гис- тон, %	ДНК — гис- тон, %
Пурпурогаллин						
1	3,94	32,12	1,34	1,58	4,17	4,91
2	4,06	35,25	1,46	1,69	4,14	4,79
3	4,51	48,03	1,92	2,20	3,99	4,58
4	4,69	54,08	2,12	2,46	3,90	4,55
5	4,81	58,41	2,25	2,66	3,85	4,55
6	4,90	61,60	2,34	2,80	3,79	4,54
о-Дианизидин (окисленный)						
7	3,41	20,83	0,158	0,197	0,75	0,94
8	3,64	25,42	0,181	0,227	0,71	0,89
9	3,82	29,28	0,200	0,248	0,68	0,84
10	3,99	33,31	0,220	0,265	0,66	0,79
11	4,19	38,57	0,247	0,283	0,64	0,73
12	4,27	40,76	0,258	0,289	0,63	0,71

ватных капель определяется следующим гиперболическим уравнением:

$$y' = 0,712 - 0,002x + 1,263/x,$$

где y' — концентрация окисленного о-дианизидина, %; x — объем коацерватной капли, 10⁻¹² см³.

На рис. 2, 2 показаны изменения концентрации окисленного о-дианизидина при увеличении размеров капель коацерватной системы пероксидаза — о-дианизидин — гуммиарабик — гистон — окисленный о-дианизидин.

Выведенные уравнения позволяют рассчитать содержание и концентрацию продуктов ферментативного окисления в коацерватных каплях определенного размера.

Рассчитанные величины коэффициента корреляции r ($r=0,71-0,98$) указывают на сильную корреляцию между экспериментальными данными и значениями, полученными по уравнениям, и свидетельствуют о достоверности полученных результатов.

При сравнении белково-углеводных и белково-нуклеиновых коацерватных капель было установлено, что химический состав капель может влиять на количество концентрируемых продуктов окисления.

В табл. 1 показано, что содержание и концентрация окисленных соединений выше в коацерватных каплях, состоящих из ДНК и гистона, чем в каплях из гуммиарабика и гистона того же размера. Следовательно, белково-нуклеиновые коацерватные капли обладают несколько большей способностью концентрировать продукты ферментативного окисления.

Полученные устойчивые коацерватные системы дают возможность расширить их использование в качестве предклеточных моделей.

Авторы выражают благодарность академику А. И. Опарину за его постоянное внимание и помощь в наших исследованиях.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
3 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Н. Евреинова, А. Бейли, ДАН, т. 179, 723 (1968). ² Т. Н. Евреинова, Т. В. Мамонтова и др., Журн. эволюцион. биохим. и физиол., т. 7, № 1, 23 (1971). ³ Т. Н. Евреинова, Т. В. Мамонтова и др., Применение машинного анализа для исследования коацерватных систем. Тр. 4 Междунар. Биофизич. конгр. СССР, М., 7-14 августа, т. 4, 1972, стр. 478. ⁴ Т. Н. Евреинова, Т. В. Мамонтова и др., ДАН, т. 204, № 4, 991 (1972). ⁵ А. И. Опарин. Жизнь, ее природа, происхождение и развитие, М., «Наука», 1968. ⁶ Ю. Р. Хруст, Л. Л. Литинская и др., Цитология, т. 13, 12, 1525 (1971). ⁷ Т. N. Evreinova, T. W. Mamontova et al., J. Coll. and Interface Sci., v. 36, 18 (1971).