

Е. Ф. ХАРАТЬЯН, Э. И. ЗАЙЧКИН, Л. Н. КАЦ, академик А. И. ОПАРИН

К ИЗУЧЕНИЮ ФРАКЦИИ МЕМБРАН *MICROCOCCLUS* *LYSODEIKTICUS* МЕТОДОМ ЗАМОРАЖИВАНИЯ — ТРАВЛЕНИЯ

Известно, что при использовании метода замораживания с разломом и последующего травления льда в вакууме * мембраны раскалываются как поперек, так и вдоль своих слоев ((¹⁻³) и др.). В первом случае на поверхности скола мембрана имеет трехслойное строение, как и на ультратонких срезах. Во втором случае она расщепляется вдоль гидрофобного слоя с образованием двух поверхностей скола (т. е. двух комплементарных поверхностей), различающихся распределением глобулярных частиц и отражающих внутреннюю структуру мембраны. Так, при продольном расщеплении цитоплазматической мембраны бактерий та половинка мембраны, которая прилегает к клеточной стенке и обращена в сторону цитоплазмы, обычно вогнута и содержит на поверхности скола редко расположенные глобулярные частицы размером 8—12 нм (в.д.м.). Напротив, вторая половинка мембраны, прилежащая к цитоплазме и обращенная к клеточной стенке, обычно выпукла и содержит на поверхности скола густо расположенные глобулярные частицы (в.д.м.) ((^{4, 5}) и др.).

Сведения по структуре мезосомальных мембран (их поверхности скола мы обозначаем в.м.з. и в.п.м.) более противоречивы: по одним данным, их структура иная, чем у цитоплазматической мембраны (⁶), по другим — сходная (⁷). Наконец, не вполне ясно, как ориентированы мезосомальные мембраны в клетке: так же как и цитоплазматическая мембрана, т. е. наружной стороной (в.д.м.) к поверхности мезосомы, или, наоборот, наружной стороной внутрь мезосомы (^{8, 9}). Если бы подтвердилась первая точка зрения, то следует признать, что мезосомы представляют собой замкнутые структуры и, возможно, имеют независимое от цитоплазматической мембраны происхождение. Второе предположение подтвердило бы образование всех мезосом путем инвагинации цитоплазматической мембраны внутрь цитоплазмы.

В данной работе мы попытались выяснить, одинакова ли структура обеих поверхностей мембраны, обнажающихся при сколе, у цитоплазматической мембраны и мембран мезосом и как ориентированы эти мембраны по отношению друг к другу в клетке.

Объектом исследования служила фракция мембран микрококка, полученная таким методом, чтобы избежать разрыва цитоплазматической мембраны и выхода по крайней мере большинства мезосомальных мембран за ее пределы (метод см. (¹⁰)). Замораживание — травление проводили на установке, сконструированной при участии одного из нас (¹¹) и позволяющей получать комплементарные реплики. Объект замораживали во фреоне, охлажденном до -150° жидким азотом, не прибегая к предварительной фиксации и использованию глицерина в качестве криопротектора. Нанесение проводили платиной с углеродом в течение 2 сек. под углом 30° с последующим укреплением реплик углеродом в течение 10 сек. под углом 90° .

* Следует указать, что применяют либо замораживание с разломом без травления (freeze-fracture), либо замораживание с разломом с последующим травлением (freeze-etching). Разлом (скол) производят или разрывом замороженного образца на две половинки, при этом получают две комплементарные поверхности скола, или с помощью ножа. Мы использовали принцип разрыва, хотя, как правило, не сравнивали обе комплементарные поверхности друг с другом.

Препараты фотографировали в электронном микроскопе JEM-7 при напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 30 000 $\times$.

При продольном скалывании цитоплазматической мембраны вогнутая поверхность вг.д.м., образующаяся при сколе, гетерогенна и содержит частицы размером от 5 до 15 нм (рис. 1а). Противоположная поверхность цитоплазматической мембраны (вп.д.м.) имеет часто расположенные глобулярные частицы, которые по краям нередко ориентированы в цепочки, иногда имеющие вид фибриллярных структур (рис. 1б, слева внизу). Иногда видна в виде ободка истинная наружная поверхность мембраны со

стороны клеточной стенки, обнажившаяся при неглубоком травлении. Обычно она обнажается более полно при глубоком травлении.

Помимо цитоплазматической мембраны, при замораживании — травлении можно наблюдать внутрицитоплазматические (мезосомальные) мембраны. Методом ультратонких срезов у интактных клеток микрококка обнаружены мезосомы ламеллярного и везикулярного строения (¹²), а на фракции мембран — ламеллярные структуры и отдельные разбросанные в цитоплазме везикулы (¹⁰). При замораживании — травлении ламеллярные мезосомы обычно раскалываются поверхностно, при этом структура поверхностей скола у них та-

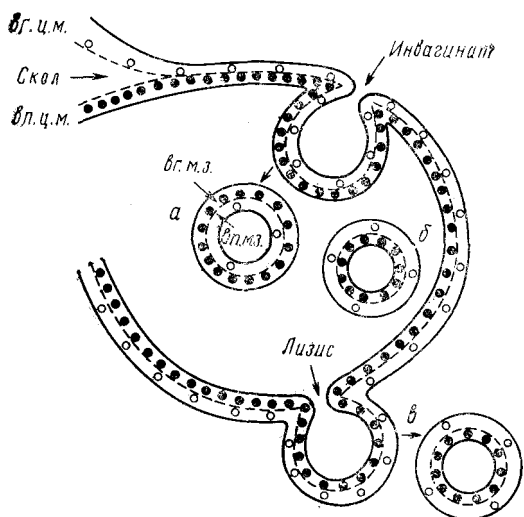


Рис. 2. Схематическое изображение возможной ориентации поверхностей скола цитоплазматической мембраны и мезосом в бактериальной клетке. Обозначения те же, что на рис. 1

кая же, как и у цитоплазматической мембраны, однако ориентация обратная. Так, вг.мз. густо покрыта глобулярными частицами размером 8–10 нм (рис. 1б, в), что характерно для вп.д.м.; напротив, вп.мз. имеет значительно более редко расположенные глобулярные частицы и напоминает вг.д.м. (рис. 1б).

Итак, сравнение структуры обеих поверхностей скола цитоплазматической мембраны и мезосом показывает, что ламеллярные мезосомы в большинстве случаев ориентированы противоположно цитоплазматической мембране, т. е. наружной стороной мембраны внутрь мезосомы.

Иногда видно, что ламеллярные мезосомы образуются при инвагинации цитоплазматической мембраны (рис. 1в, г). На поперечных сколах инвагинаты часто прижаты к цитоплазматической мембране и расплющены вдоль нее (рис. 1г, сверху). Отдельные «витки» мембран внутри мезосомы могут соединяться друг с другом фибриллярными структурами наподобие мостиков (рис. 1г, стрелка), иногда мостики соединяют мембраны с цитоплазмой. И, наконец, возможно соединение инвагината с противоположной стороной цитоплазматической мембраны (рис. 1в, стрелка).

Внутреннюю структуру мезосомы можно наблюдать, когда плоскость скола проходит через ее среднюю часть. В этом случае иногда удается видеть внутри одной мезосомы продольное скалывание через одни «витки» мембраны и поперечные — через другие. Везикулярные мезосомы на наших препаратах выявлялись в виде кольцевидных структур небольшого диаметра, обычно локализованных по периферии цитоплазмы (рис. 1г). Они не собраны в грозди, что характерно для ультратонких срезов этой бактерии (¹²).

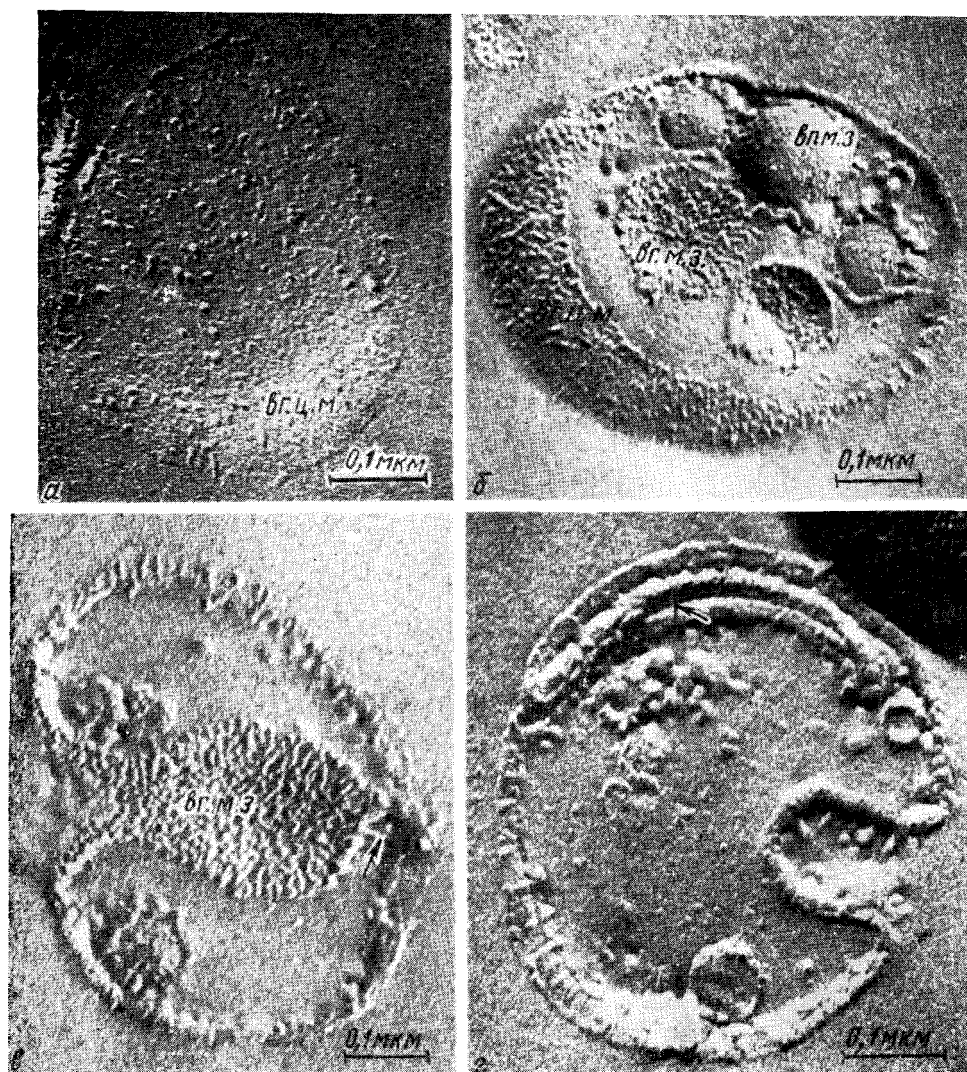


Рис. 1. Фрагменты фракции цитоплазматической мембраны и мезосом микрококка. а, б, в — 115 000X, г — 150 000X. *вп.ц.м.*, *вг.ц.м.* — выпуклая и вогнутая сторона цитоплазматической мембраны; *вп.м.з.*, *вг.м.з.* — выпуклая и вогнутая стороны мезосомы. Стрелка — см. в тексте

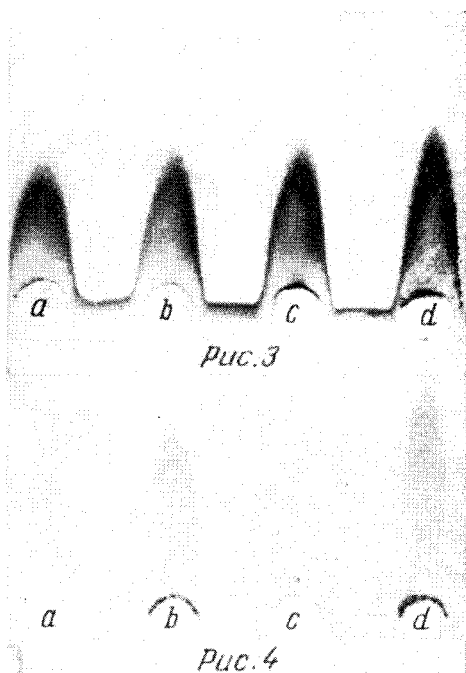
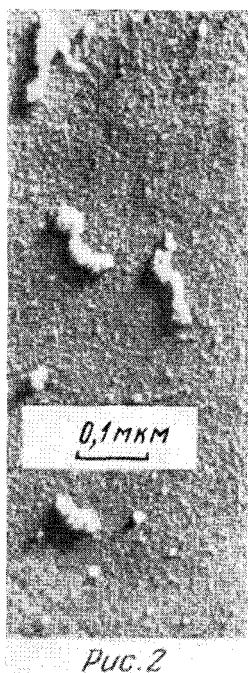


Рис. 2. Электронограмма полирибосом печени крысы. Негативный контраст

Рис. 3. Иммуноэлектродиффузионный анализ экстрактов из овоцитов, инъецированных полирибосомами (b, d), и экстрактов из контрольных овоцитов (a, c). Носитель 0,125% КСА, в геле аКСА антисыворотка

Рис. 4. Радиоавтографы с препарата рис. 3

На приведенной схеме (рис. 2) суммированы данные о возможной ориентации мезосомальных мембран по отношению к цитоплазматической мембране. В случае, если все мезосомы произошли в результате инвагинации цитоплазматической мембраны внутрь цитоплазмы, то комплементарные поверхности цитоплазматической мембраны и мезосом, обнажающиеся при сколе, должны быть ориентированы противоположно друг другу (рис. 2а). Напротив, если внутренние мембранные структуры имеют такую же ориентацию, как и цитоплазматическая мембрана, то это означает либо их независимое происхождение от цитоплазматической мембраны, либо то, что они образуются не путем инвагинации, а каким-либо другим способом (рис. 2б). При лизисе бактериальной клетки происходит выворачивание мезосом в противоположную сторону (рис. 2в). В этом случае мембранные структуры располагаются снаружи от цитоплазматической мембраны, а их поверхности скола имеют такую же ориентацию слоев, как и цитоплазматическая мембрана. Последнее подтверждается данными литературы⁽⁹⁾.

Не вызывает сомнения, что при исследовании структуры цитоплазматической мембраны и мезосом во фракциях мембран нельзя не учитывать возможных изменений по сравнению с интактными клетками. Так, из данных литературы известно, что при лизисе везикулярные мезосомы рассыпаются на отдельные везикулы или представляют собой длинные нити, напоминающие нити жемчуга, в то время как ламеллярные мезосомы обычно имеют вид замкнутых кольцевидных структур. Однако можно думать, что если структура мезосом изменяется, то ориентация мембран сохраняется в такой мере, как это показано на схеме (рис. 2). Тем не менее, существует и противоположное мнение о возможной дислокации мембранных белков с внутренней стороны мембраны на наружную при получении фракции мембран⁽¹³⁾. Наконец, следует учитывать различия в структуре везикулярных и ламеллярных мезосом, обнаруженные методом замораживания — травления⁽⁴⁾. В данной работе рассматривается структура главным образом ламеллярных мезосом.

Проведенные исследования показали перспективность применения метода замораживания — травления для изучения мембранного аппарата бактериальной клетки. Они подтвердили наши прежние представления^(14, 15), а также данные других исследователей⁽¹²⁾ о едином происхождении всех внутриклеточных мембран у гетеротрофных бактерий.

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

Поступила
28 III 1975

Институт физиологии и биохимии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушчино-на-Оке

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Meyer, H. Winkelmann, *Protoplasma*, v. 68, 253 (1969).
- ² P. Silva, D. Branton, *J. Cell Biol.*, v. 45, 593 (1970).
- ³ В. Л. Боровягин, *Усп. совр. биол.*, т. 77, 346 (1974).
- ⁴ S. Holt, E. Leadbetter, *Bacteriol. Rev.*, v. 33, 346 (1969).
- ⁵ C. Remsen, S. Watson, *Intern. Rev. Cytol.*, v. 33, 253 (1972).
- ⁶ N. Nanninga, *J. Cell Biol.*, v. 39, 251 (1968).
- ⁷ W. Koning et al., *J. Bacteriol.*, v. 116, 1456 (1973).
- ⁸ H. Morioka et al., *J. Electron Microscopy*, v. 22, 255 (1973).
- ⁹ U. Sleytr et al., *J. Bacteriol.*, v. 118, 693 (1974).
- ¹⁰ Е. Ф. Харатьян и др., *ДАН*, т. 219, 990 (1974).
- ¹¹ Б. А. Фукте и др., Новые методы физического препарирования биологических объектов для электронно-микроскопических исследований, М., «Наука», 1973.
- ¹² В. И. Бурюзова, Мембранные структуры микроорганизмов, М., «Наука», 1973.
- ¹³ A. Altendorf, L. Stachelin, *J. Bacteriol.*, v. 117, 883 (1974).
- ¹⁴ Л. Н. Кац, *Усп. микробиол.*, т. 9, 25 (1974).
- ¹⁵ А. А. Авакян и др., Атлас бактерий, патогенных для человека и животных, М., «Медицина», 1972.