

Академик А. И. ОПАРИН, А. Ф. ОРЛОВСКИЙ, В. Я. БУХЛАЕВА, К. Л. ГЛАДИЛИН

ВЛИЯНИЕ НА КОАЦЕРВАТНУЮ СИСТЕМУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО СИНТЕЗА ПОЛИАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Коацерватные системы представляют собой двухфазные коллоидные системы, состоящие из коацерватных капель и окружающей их равновесной жидкости. В теории происхождения жизни коацерватные капли рассматриваются как модель предклеточных структур, эволюция и предбиологический отбор которых привели к возникновению пробионтов — непосредственных предшественников первых организмов (¹). Если в коацерватных каплях содержатся катализаторы, в том числе и ферменты, а в равновесной жидкости вещества, способные проникать в капли и претерпевать там химические превращения, то капли превращаются в термодинамически открытые системы. В плане предбиологической эволюции и отбора наиболее существенны окислительно-восстановительные реакции, образование макроэргических связей и синтез полимерных веществ.

В данной работе исследовано влияние на белково-углеводную коацерватную систему протекающего в ней синтеза полиадениловой кислоты (полиА) из АДФ под действием фермента полинуклеотидфосфорилазы.

Полинуклеотидфосфорилаза (нуклеозиддифосфат : полинуклеотиднуклеотидилтрансфераза; ЕС 2.7.7.8) выделена из *Azotobacter vinelandii* по методу М. Грюнберг-Маного и С. Очоа (²). Активность препарата 6 усл. ед., т. е. 1 мг белка препарата катализировал превращение 6 мкмол. АДФ в полиА за 30 мин. при 37°. Субстрат — АДФ фирмы «Serva». Молярное отношение АДФ : $MgCl_2 = 2 : 1$ (³). Реакцию проводили при pH 8,0.

Для образования коацерватной системы использовали гистон, выделенный из зубной железы телянка по методу Л. Гнилицы (⁴), и полисахарид гуммиарабик фирмы «Merck». При pH 8,0 молекулы гистона несут положительный заряд (изоэлектрическая точка 9,5–10), а гуммиарабика — отрицательный (изоэлектрическая точка около 1,2).

Состав коацерватной системы (на 1 мл): буфер трис-HCl pH 8,0 300 мкмол.; полинуклеотидфосфорилаза 0,06 мг белка препарата; гистон 2,5 мг; гуммиарабик 0,17 мг; АДФ 10 мкмол.; $MgCl_2$ 5 мкмол. Водные растворы компонентов добавлялись в порядке их перечисления, данного выше. Раствор АДФ перед добавлением доводили КОН до pH 8,0.

Реакцию останавливали через определенные промежутки времени добавлением к 0,5 мл коацерватной системы 2,5 N $HClO_4$ до концентрации 0,5 N. Образовавшиеся осадки, содержащие синтезированную полиА, отмывали от сорбированной АДФ 0,5 N $HClO_4$ на мембранных фильтрах «Сынпор» с диаметром пор 0,6 мкм до отсутствия поглощения при 257 нм в фильтрате. Гидролиз полиА проводили в 0,5 N $HClO_4$ на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Гидролизат фильтровали через мембранный фильтр «Сынпор» с диаметром пор 0,23 мкм. Поглощение в фильтрате измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 257 нм. Величину поглощения АМФ, образовавшейся при гидролизе полиА, получали вычитанием поглощения контроля из поглощения опытного образца. Контролем служили коацерватные системы того же состава, что и опытные, но $HClO_4$ добавлялась к ним сразу же после образования системы. Количество образовавшейся за определенное время полиА рассчитывали по молярному коэффициенту экстинкции.

Для определения количества фермента, связанного с каплями, фазы коацерватной системы после ее образования разделяли центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин. Равновесную жидкость (надосадо-

ную) ставили на инкубацию при 37°. Было установлено, что количество синтезированной в ней полиА менее 5% от полиА, образующейся во всей коацерватной системе. Таким образом, можно утверждать, что более 95% ферментативной активности связано с коацерватными каплями.

Влияние синтеза полиА на коацерватную систему исследовали с помощью светового микроскопа с нагревательным столиком при 37°, а также регистрировали при помощи метода светорассеяния (⁵, ⁶).

Препараты для микроскопии и микрофотографирования готовили следующим образом. На предметное стекло на расстоянии 0,8–0,9 размера покровного стекла помещали под прямым углом друг к другу 4 иглообразные пластинки, полученные разламыванием покровного стекла. В пространство между иглами наносили порядка 0,2 мл коацерватной системы при помощи пастеровской пипетки, а затем закрывали покровным стеклышком. Край покровного стекла заливали канадским бальзамом.

Измерение светорассеяния проводили в кюветах толщиной 0,1 см на спектрофотометре СФ-4А при 800 и 1000 нм (зависимость логарифма мутности системы в этом интервале от логарифма длин волн линейна, а поглощение света отсутствует). Расчеты среднего размера коацерватных капель и их числа проводили по таблицам из (⁷). Средние значения величины и доверительные интервалы с вероятностью 0,95 рассчитаны по способу малых выборок. Количество параллельных выборок обеспечивает величину доверительного интервала, не превышающую 5% от средних значений.

В системе без фермента средний объем коацерватных капель и их агрегатов увеличивается с течением времени только за счет коалесценции капель. При этом число капель уменьшается. Суммарный объем капель, получаемый умножением среднего объема капель на их число, остается неизменным (⁸). В системе с ферментом (результаты представлены на рис. 1) активно протекает синтез полиадениловой кислоты. Средний размер капель и их агрегатов возрастает как за счет коалесценции капель, так и в результате синтеза полиА. При этом увеличение суммарного объема капель пропорционально синтезу полиА.

Изменение размеров индивидуальных капель при синтезе полиА представлено на рис. 2. На фотографии видно увеличение размеров как отдельных капель, так и капель в агрегатах (слипшихся капель). При этом следует обратить внимание на тот факт, что капли различаются по степени увеличения их размеров. Так, капли, помеченные №№ 1–3, увеличились значительно: объем 1-й капли возрос в 2,2 раза, 2-й и 3-й — в 2,1. Капли, помеченные №№ 4 и 5, увеличились незначительно (их объем возрос в 1,5 и 1,4 раза соответственно), а капли, помеченные №№ 6, 7, практически не изменились за 2 часа наблюдения за системой. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в одной и той же системе мы наблюдаем дифференциацию капель по интенсивности синтеза в них полиА. Аналогичная дифференциация капель может быть выявлена добавлением к системе без фермента красителя толуидинового голубого в количестве порядка 100 мкг на 1 мл системы (рис. 3).

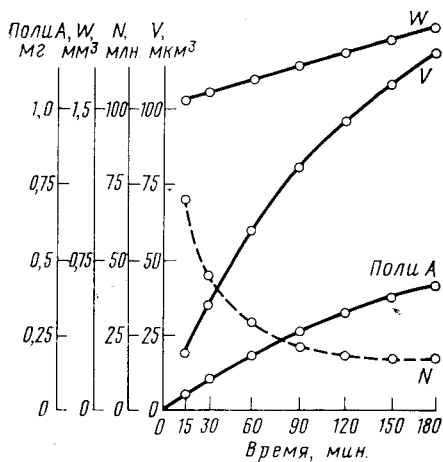


Рис. 1. Изменение во времени среднего (V) и суммарного (W) объемов коацерватных капель и их числа (N) в 1 мл белковоуглеводной коацерватной системы при ферментативном синтезе в ней полиадениловой кислоты (полиА).

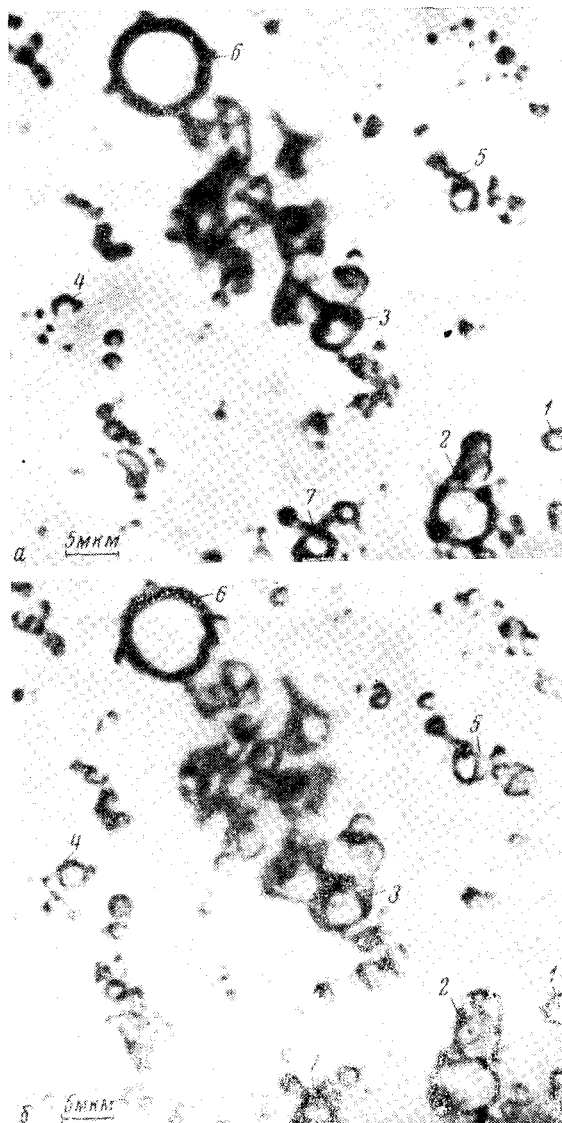


Рис. 2

Рис. 2. Увеличение размеров коацерватных капель при синтезе в системе полиадениловой кислоты: а — система через 15 мин., б — через 120 мин. после начала синтеза. (Пояснения в тексте)

Рис. 3. Индивидуальные различия коацерватных капель в поглощении ими красителя толуидинового голубого



Рис. 3

Следует подчеркнуть, что дифференциация капель в одной коацерватной системе в плане протекания в них ферментативных процессов могла послужить фактором действия предбиологического отбора предклеточных структур. Выявленное различие в скорости увеличения коацерватных капель в одной и той же системе при синтезе в ней полиА и различия в составе капель, выявляемые красителем, представляют существенный интерес в плане моделирования первичных форм обмена веществ и предбиологического отбора предклеточных структур.

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

Поступило
15 X 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Опарин, Жизнь, ее природа, происхождение и развитие, «Наука», 1968.
- ² M. Grunberg-Manago, S. Ochoa, J. Am. Chem. Soc., v. 77, 11, 3165 (1955).
- ³ F. R. Williams, T. Godefroy et al., Biochim. et biophys. acta, v. 80, 8384, 349 (1964).
- ⁴ L. Hnilica, S. Hupka, Biologia, v. 14, 821 (1959).
- ⁵ К. Л. Гладилин, А. Ф. Орловский и др., ДАН, т. 206, № 4, 995 (1972).
- ⁶ К. Л. Гладилин, А. Ф. Орловский и др., Биофизика, т. 19, 2, 260 (1974).
- ⁷ К. Л. Гладилин, А. Ф. Орловский, ДАН, т. 211, № 1, 230 (1973).
- ⁸ К. Л. Гладилин, Характеристика коацерватных систем по размерам капель и их устойчивости. Канд. дисс., М., 1974.