



УДК 577.15.578.088

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННО-ПЛОТНЫХ МЕТОК \*

*Левченко Л. А., Раевский А. В., Салитра И. С.,  
Пивоварова Т. С., Лихтенштейн Г. И.*

*Институт химической физики Академии наук СССР, Черноголовка*

Метод электронно-плотных меток в сочетании с методом электронной микроскопии применен для изучения топографии функциональных групп в белках и мембранах. Показано, что, используя различные реагенты-посредники, можно «трансформировать» избранные функциональные группы в SH-группы, которые затем могут быть модифицированы многоядерным ртутьорганическим соединением — ЭОГМ. Применение в качестве реагента-посредника 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина позволило ввести сульфгидрильные группы в гистидиновые и лизиновые остатки альбумина и лизоцима и изучить их топографию. Использование в качестве посредника ДДМ позволило выявить расположение гидрофобных участков в биологических мембранах. При этом в мембранах *Azotobacter vinelandii* обнаружены зоны регулярного расположения электронно-плотной метки.

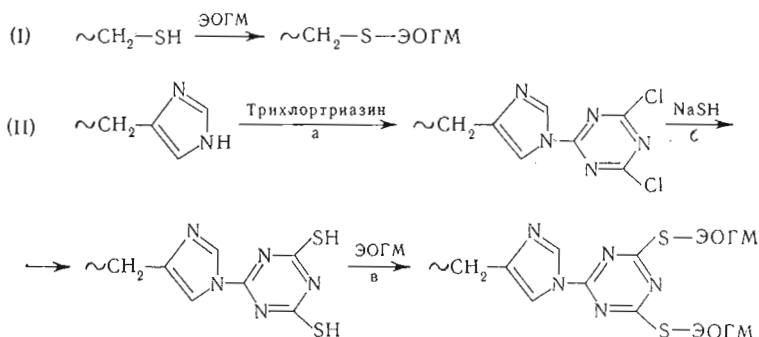
В работах [1—2] нами была показана возможность использования метода электронной микроскопии для исследования топографии активных центров ферментов. Необходимым условием этих исследований является предварительная специфическая модификация функциональных групп активного центра ионами тяжелых металлов (электронно-плотными метками). Так, при избирательной модификации железосодержащего участка активного центра нитрогеназы ПХМБ удалось выявить групповое расположение 32 атомов негемового железа в виде четырехугольного кластера [1]. Использование в качестве модифицирующих агентов многоядерных ртутьорганических соединений существенно расширяет возможности метода и позволяет наблюдать отдельные функциональные группы активного центра. В частности, оказалось возможным изучить топографию двух свободных сульфгидрильных групп АТР-азного участка активного центра нитрогеназы путем блокирования их ЭОГМ [2]. Молекулы ЭОГМ содержат 6 атомов ртути и соответственно обладают высокой электронной плотностью. На электронных микрофотографиях они имеют вид гранул размером  $\sim 6-7 \text{ \AA}$  (рис. 1, а).

В настоящей работе показано, что метод электронно-плотных меток может быть применен для изучения топографии различных функциональных групп путем «трансформации» их в SH-группы с последующим блокированием SH-групп ЭОГМ.

\* Принятые сокращения: ЭОГМ — этаноксигексамеркарбид, ДДМ — *n*-додецилмеркаптан, ДДС — додецилсульфат натрия, ПХМБ — *n*-хлормеркурибензоат, ККМ — критическая концентрация мицеллообразования.

Одна из возможностей такой трансформации заключается в применении в качестве реагента-посредника 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина, позволяющего ввести сульфгидрильные группы в гистидиновые или лизиновые остатки белков. Вторая возможность заключается в использовании в качестве посредника ДДМ, который, имея неполярный фрагмент, позволяет выявить гидрофобные участки. Это продемонстрировано на примере простейших модельных мембранных систем, полученных по методике [3], а также на примере биологических мембран, выделенных из *Azotobacter vinelandii*.

Модификация осуществлялась по следующим схемам:



Полученные результаты свидетельствуют о возможности введения в гистидиновые и лизиновые остатки белков свободных сульфгидрильных групп, которые легко могут быть заблокированы ЭОГМ по реакции (IIв). Наибольший интерес представляют опыты с лизоцимом (КФ 3.2.1.17), молекула которого содержит лишь один гистидиновый остаток. В результате модификации этого фермента трихлортриазинем в препаратах обнаруживались 1—2 свободные SH-группы, что соответствует теоретически возможному числу.

На рис. 1, б представлены электронные микрофотографии модифицированного лизоцима. В отличие от одиночных шестиангустренных гранул ртути, которые можно наблюдать на электронных микрофотографиях ЭОГМ (рис. 1, а), на рис. 1, б видны электронно-плотные гранулы размером  $\sim 14\text{--}16 \text{ \AA}$ , что соответствует размеру двух близко расположенных молекул ЭОГМ. Контуры белковой глобулы лизоцима здесь практически не видны, поскольку глобула очень мала и молекулы ЭОГМ закрывают большую часть ее поверхности.

Сходная картина распределения ЭОГМ наблюдается на электронных микрофотографиях модифицированного трихлортриазина (рис. 1, в). Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что реакция трихлортриазина с NaSH и ЭОГМ приводит к 100%-ной модификации этого соединения (титруется 3 SH-группы).

Однако на электронных микрофотографиях проявляются преимущественно парные гранулы ЭОГМ, а не тройные, как этого следовало бы ожидать. Процент тройных гранул невелик — около 20—30. Возможно, что этот эффект связан со спецификой ориентации модифицированных молекул трихлортриазина на формваровой подложке.

Опыты с сывороточным альбумином наглядно подтвердили возможность модификации значительного числа лизиновых и гистидиновых групп по схеме (II). Распределение ЭОГМ на электронных микрофотографиях модифицированного альбумина (рис. 1, г) находится в согласии с количеством свободных SH-групп в молекуле альбумина (9—10 SH-групп), полученным в результате его модификации трихлортриазинем и NaSH.

В качестве простейших модельных мембранных систем были использованы растворы ДДС. Известно, что при определенной концентрации

(ККМ) в таких растворах возникают мицеллы сферической формы. ККМ для ДДС равна 0,23% [3]. В состав одной сферической мицеллы входит ~ 60 молекул ДДС. По данным рентгеноструктурного анализа, размер такой мицеллы составляет ~ 30 Å [4].

Для исследования мицеллообразования в растворах ДДС был применен ДДМ. ДДМ вводился в 0,23%-ный раствор ДДС в соотношении 1 : 10, т. е. ~ 5—6 молекул ДДМ на 1 мицеллу. Полученный раствор обрабатывали ЭОГМ и исследовали с помощью электронного микроскопа. В результате на микрофотографиях указанных препаратов можно наблюдать электронно-плотные шаровидные образования, построенные 4—6 молекулами ЭОГМ и имеющие размеры порядка ~ 40 Å (рис. 2). На наш взгляд, наблюдаемая картина свидетельствует о вхождении ДДМ в ДДС-мицеллы

Препараты	Концентрация SH-групп после насыщения препаратов ДДМ, $M \cdot 10^4$	Концентрация SH-групп после обработки насыщенных ДДМ препаратов ЭОГМ, $M \cdot 10^4$
0,025 М трис-HCl (рН 7,0)	1,1	—
Раствор мембран с оптической плотностью 0,03 ( $\lambda_{\text{пр}}$ 597 нм)	3	—
Раствор мембран с оптической плотностью 1,05 ( $\lambda_{\text{пр}}$ 597 нм)	24	7,5

в заданном соотношении. Необходимо отметить, что при этом в спектрах поглощения исследуемых препаратов наблюдалась характерная для Hg—S-связи полоса поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  250 нм.

Таким образом, данные, полученные в опытах с мицеллами, показывают, что ДДМ можно использовать в качестве реагента-посредника для выявления гидрофобных участков и в сложных биологических системах. В качестве последних были выбраны мембраны *Azotobacter vinelandii* (рис. 3, а).

В таблице представлены результаты, свидетельствующие о внедрении ДДМ в нативные биологические мембраны. Исходная концентрация SH-групп в препарате мембран была равна нулю. Показано, что с повышением концентрации мембран в растворе количество внедрившегося ДДМ увеличивается, что выражается в увеличении числа титрующихся SH-групп. Обработка насыщенных ДДМ мембран ЭОГМ приводила к блокированию 70% SH-групп. Это говорит об успешной модификации гидрофобных участков исследуемой системы.

На рис. 3, б и в представлены электронные микрофотографии модифицированных мембран *Azotobacter*, на которых отчетливо видны зоны регулярного, строго упорядоченного расположения ЭОГМ. В этих зонах метка расположена параллельными слоями. Слои прерывисты и имеют вид пунктирных линий. Толщина слоя ~ 15 Å. Расстояния между центрами слоев ~ 30 Å. Размер электронно-плотных гранул, образующих эти слои, ~ 15 × 30 Å. Гранулы соседних слоев расположены по отношению друг к другу в шахматном порядке. Судя по размеру индивидуальных молекул ЭОГМ, одна такая гранула должна содержать минимум 8 молекул ЭОГМ, расположенных бислойно (рис. 4). Следует отметить, что описанная картина характерна лишь для неповрежденных мембран и исчезает при разрушении последних. Обработка модифицированных мембран 0,2%-ной



Рис. 1. Электронные микрофотографии: *a* — молекул ЭОГМ ( $c 1 \cdot 10^{-4}$  M); *б* — молекул лизоцима, модифицированных ЭОГМ по схеме (II) без обработки контрастером; *в* — молекул трихлортриазина, модифицированных ЭОГМ по схеме (II, б, в); *г* — молекул альбумина, модифицированных ЭОГМ по схеме (II) без обработки контрастером

Рис. 2 (нижнее фото). Электронная микрофотография ДДС-мицелл, модифицированных ЭОГМ при посредстве ДДМ (увеличение 700 000)

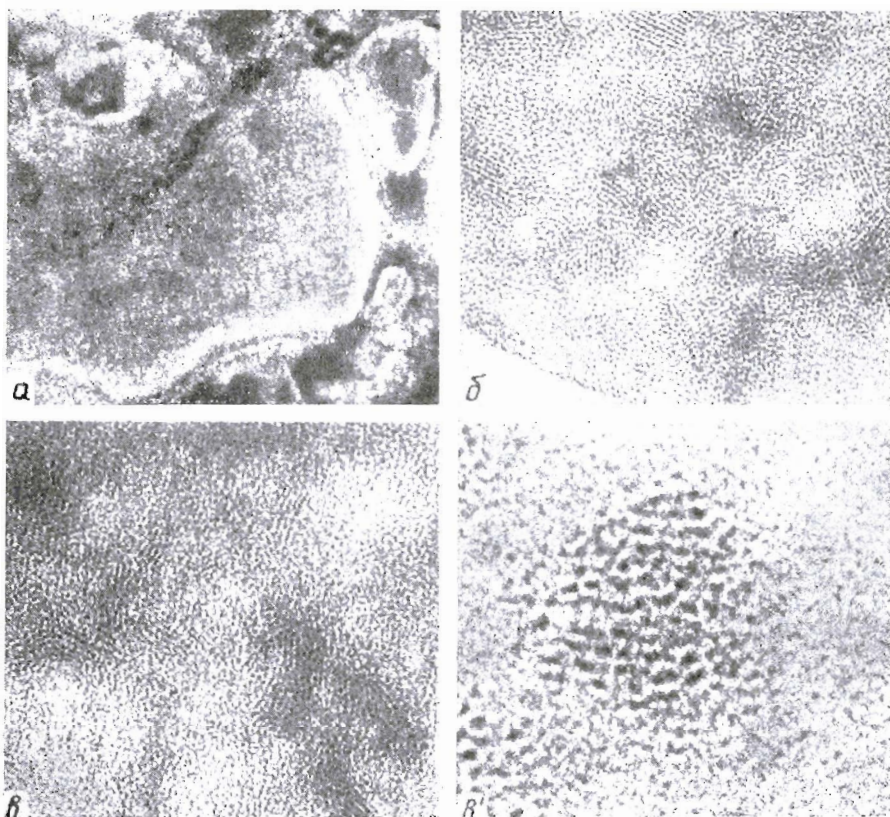


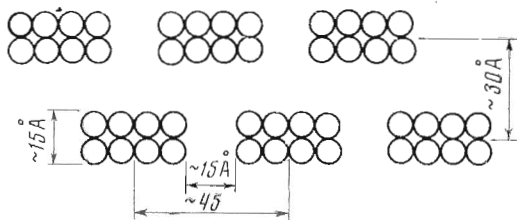
Рис. 3. Электронные микрофотографии: *a* — контрольных мембран *Azotobacter*, негативное контрастирование 1%-ной фосфорно-вольфрамовой кислотой; *б* — мембран *Azotobacter*, насыщенных ДДМ и модифицированных ЭОГМ, обработка 0,2%-ной фосфорно-вольфрамовой кислотой; *в* и *в'* — мембран *Azotobacter*, насыщенных ДДМ и модифицированных ЭОГМ без обработки контрастером (*a*, *б*, *в* — увеличение 200 000; *в'* — увеличение 700 000)



фосфорно-вольфрамовой кислотой несколько стабилизирует их, не оказывая заметного влияния на характер распределения ЭОГМ (рис. 3, б).

Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют о наличии в мембранах зон с упорядоченным расположением гидрофобных участков. Учитывая данные о строении мембран *Micrococcus lysodeikticus*, под-

Рис. 4. Схема расположения гидрофобного зоида (ДДМ + ЭОГМ) в параллельно исчерченных зонах мембран *Azotobacter vinelandii*



вергшихся кратковременному протеолизу [5], можно полагать, что эта упорядоченность относится к белковолипидным или липидным мембранным комплексам.

Таким образом, использование реагентов-посредников значительно расширяет возможности метода электронно-плотных меток и позволяет изучать топографию избранных функциональных групп в белках, мембранах и других сложных биологических системах.

#### Экспериментальная часть

Для модификации белков по схеме (II) раствор трихлортриазина в ацетоне вводили в инкубационную смесь из расчета 5—10 моль/моль белка. Конечная концентрация ацетона в инкубационной смеси не превышала 10% по объему. Для сыровоточного альбумина рН среды 9,0 (0,05 М боратный буфер), для лизоцима рН 6,5 (0,06 М фосфатный буфер). Время инкубации с трихлортриaziном 30—60 мин при 0°. Раствор NaSH добавляли из расчета 2 моль/моль трихлортриазина. Полученные таким образом препараты очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (сыровоточный альбумин) и G-15 (лизоцим). Число образовавшихся свободных SH-групп определяли по реакции с ПХМБ и последующим обратным спектрофотометрическим титрованием в присутствии глутатиона и 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоата) [6]. Раствор ЭОГМ готовили по методике, описанной в работе [2]. Степень блокирования свободных SH-групп молекулами ЭОГМ контролировали методом амперометрического титрования [7].

Модельные мембранные системы (ДДС-мицеллы) получали по методу [3]. ДДМ, примененный для исследования строения этих систем, синтезировали по методу [8]. ДДС-мицеллы, модифицированные ДДМ, обрабатывали ЭОГМ в течение 10 ч при комнатной температуре и исследовали с помощью электронного микроскопа.

Нативные мембраны выделяли из бесклеточного экстракта *Azotobacter vinelandii* методом дифференциального центрифугирования. Для работы использовали фракцию частиц, полученную при ускорении 15 000 g. Осадок ресуспендировали в 0,025 М трис-HCl-буфере при рН 7,0. Затем мембраны обрабатывали ДДМ и ЭОГМ в течение 30 мин при комнатной температуре и регулярном перемешивании.

Техника приготовления образцов для электронно-микроскопических исследований существенно не отличалась от ранее описанной [2, 9]. Для исследования контрольных препаратов мембран *Azotobacter* применяли метод негативного контрастирования [10]. В качестве контрастера использовали 1%-ный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), рН 7,0. Модифицированные ЭОГМ мембраны в 0,025 М трис-HCl-буфере наносили на сетки с фармваровой подложкой, стабилизированной углеродом, и исследовали в электронном микроскопе сразу же после нанесения

либо после подсыхания и хранения в атмосфере аргона. Часть модифицированных ЭОГМ мембран обрабатывали 0,2%-ным раствором ФВК (рН 7,0). При этом, как и в случае контрольных мембран, контрастер наливали в часовые стекла и сверху наслаивали равный объем суспензии мембран. На поверхность приготовленной таким образом смеси помещали сетки. Время взаимодействия с ФВК 2—3 мин. Работа выполнена на электронном микроскопе НУ-125Е-1, ускоряющее напряжение 100 кВ, рабочее увеличение 100 000. Разрешающая способность прибора 4—5 Å.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Левченко Л. А., Раевский А. В., Садков А. П., Лихтенштейн Г. И. (1973) Докл. АН СССР, **241**, 238—240.
2. Лихтенштейн Г. И., Левченко Л. А., Раевский А. В., Садков А. П., Пивоварова Т. С., Гвоздев Р. И. (1973) Докл. АН СССР, **243**, 1442—1444.
3. Waggoner A. S., Griffith O. H., Christensen C. R. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **57**, 1198—1205.
4. Luzzati V., Mustacchi H., Skoulios A. (1958) Discussions of the Faraday Society, **25**, 43—50.
5. Бирюзова В. И. (1973) Мембранные структуры микроорганизмов, стр. 87, «Наука», М.
6. Гвоздев Р. И., Садков А. П., Левченко Л. А., Куликов А. В., Воробьев Л. В. (1971) Изв. АН СССР. Сер. биол., **2**, 246—253.
7. Benesh R. E., Lardy H. A., Benesh R. (1955) J. Biol. Chem., **216**, 663—676.
8. Синтезы органических препаратов (1952) Под ред. Б. А. Казанского, ИЛ, т. 3, 246—248.
9. Сырцова Л. А., Левченко Л. А., Фролов Е. Н., Лихтенштейн Г. И. (1971) Молекулярн. биология, **5**, 726—733.
10. Brenner S., Horne R. (1959) Biochim. et biophys. acta, **34**, 103—110.

Поступила в редакцию  
14.II.1975

#### THE STRUCTURAL INVESTIGATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS BY THE METHOD OF ELECTRON-DENSITY LABELS

LEVCHENKO L. A., RAEVSKII A. V., SALITRA I. S.,  
PIVOVAROVA T. S., LIKHTENSTEIN G. I.

*Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences  
of the USSR, Chernogolovka*

Histidine and lysine residues in proteins can be modified by ethanoxyhexamercarbide with trichlorotriazine as an intermediate reagent followed by electron microscopy investigation of their topography. The use of dodecylmercaptane as an intermediate reagent permits to locate hydrophobic sites in biological systems.