

57
А-71



БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

МАМОНТОВА

Татьяна Викторовна

КОАЦЕРВАТНЫЕ СИСТЕМЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ
ФЕРМЕНТЫ

03.00.04 - Биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА • 1973

Работа выполнена на кафедре биохимии растений Биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (заведующий кафедрой академик А. С. Спирин).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, Т. Н. ЕВРЕИНОВА

официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Б. Н. ТАРУСОВ

доктор химических наук, доцент В. Н. ИЗМАЙЛОВА

Ведущее учреждение - Институт биохимии им. А. Н. Баха

Академия Наук СССР

Автореферат разослан " " _____ 1974 г.

Защита диссертации состоится " " _____ 1974 г.

в 15 час. на заседании Секционного Совета по ботанике физиолого-биохимического отделения (Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

Биологического факультета МГУ.

Ученый секретарь Совета
канд. биол. наук:

(Л. Ф. НИКОЛАЕВА)

57 581.19

А 71

КОАЦЕРВАТНЫЕ СИСТЕМЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

I. Определение понятия коацерватных систем

В своей теории о происхождении жизни на Земле академик А. И. Опарин придает большое значение выделению из первичного океана крупных надмолекулярных комплексов в виде коацерватных капель. Гидрофильные коацерватные системы впервые были изучены в 30-х годах нашего века голландским ученым Бунгенберг-де-Йонгом.

Коацерватные системы могут быть получены из разбавленных водных растворов (0,001%) биополимеров: белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, а также из синтетических полимеров, например, из полилизина и полиаденина. Они состоят из коацерватных капель, обогащенных полимерными молекулами, и равновесной жидкости, в которой полимерные соединения практически отсутствуют. Диаметр коацерватных капель колеблется от 0,5 мкм до 640 мкм.

Слово коацервация происходит от латинского слова "co-accervare" - давать рой. Большая роль в образовании коацерватных капель принадлежит силам электростатического притяжения, а также гидрофобным взаимодействиям. В процессе коацервации происходит концентрирование молекул в коацерватных каплях. Евреиновой Т. Н. было показано, что концентрация молекул полимеров в индивидуальных коацерватных каплях может возрастать в десятки и сотни раз по сравнению с растворами, из которых они возникли.

Благодаря своим концентрационным свойствам коацерваты нашли применение в промышленности: фармацевтической, пищевой, текстильной. На основе коацервации разрабатываются технологические процессы микроинкапсуляции.

В настоящее время коацерватные капли рассматриваются как одна из возможных предклеточных моделей.

В ходе эволюции материи процесс коацервации должен был явиться мощным средством концентрирования высокомолекулярных веществ, растворенных в земной гидросфере в виде коацерватных капель. Дальнейшее усовершенствование коацерватных капель



на основе каталитических процессов могло привести к появлению примитивных предшественников живого на Земле (3-3,5 млрд. лет тому назад). Кроме коацерватных капель моделями предлеточных структур являются также липопротеидные пузырьки Гольдейкра и микросферы фокса. Липопротеидные пузырьки образуются в океане на поверхности волн. Они заполнены внутри водой и легко разрушаются. Протеиноидные микросферы фокса состоят из искусственно синтезированных белковоподобных соединений. Микросферы - очень плотные образования и почти не содержат воды, т.е. отсутствует условие совершенно необходимое для жизни.

Коацерватные капли выгодно отличаются от этих двух моделей: во-первых, они могут быть получены из разнообразных полимерных соединений, как из абиогенно синтезированных, так и из природных белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов; во-вторых, они содержат и воду, в-третьих, по некоторым свойствам капли близки к протоплазме живых организмов. В настоящее время известно свыше 250 различных коацерватных систем. Биохимическая классификация коацерватных систем впервые была дана Евреиновой Т.Н. в 1962 году.

По своему химическому составу коацерватные системы разделены на 17 групп. I. Белковые. 2. Углеводные. 3. Коацерваты с таннином. 4. Белково-углеводные. 5. Белково-белковые. 6. Коацерваты с нуклеиновыми кислотами. Коацерваты с мононуклеотидами. 8. Коацерваты с аминокислотами. 9. Коацерваты с красителями. 10. Коацерваты с флуоресцирующими красителями: акридиноранжем, эухризином, ауэфосфином и др. II. Фосфатидные коацерваты. 12. Белок-фосфатид-белок. 13. Олеатные коацерваты. 14. Белково-олеатные коацерваты. 15. Многокомпонентные коацерваты. 16. Протоплазма, лимфа. 17. Особая группа коацерватных систем, содержащих ферменты. В этой группе моделируются различные ферментативные реакции.

Коацерватные системы, с включенными в них ферментами, являются очень удобными моделями для воспроизведения тех возможных путей, которыми шло начальное формирование как структуры, так и обмена веществ у исходных для возникновения жизни систем.

В настоящее время в лабораторных условиях в коацерватных системах моделированы следующие ферментативные реакции:

1/ Гидролитическое расщепление полисахаридов, нуклеиновых кислот, белков.

2/ Синтез полисахаридов и полинуклеотидов.

3/ Окислительно-восстановительные процессы, а также расщепление перекиси водорода каталазой.

Однако, все известные до 1968 года коацерватные системы обладали неустойчивостью. В этих системах капли оседали под действием силы тяжести на дно сосуда, сливались (коалесцировали) друг с другом, образуя сплошной слой. Первая устойчивая коацерватная система была получена в 1968 году в результате моделирования ферментативной реакции окисления пирокатехина в хиноны полифенолоксидазой (Евреинова Т.Н., Бейли А., 1968). Коацерватные капли, стабилизированные хинонами, оседая на дно пробирки, не сливаются и могут сохраняться годами.

Целью данной работы являлось получение устойчивых коацерватных систем и исследование их свойств.

I. Стабилизацию проводили при участии окислительных ферментов пероксидазы (К.Ф. I.II.I.7) и полифенолоксидазы (К.Ф. I.IO.3.I) и их субстратов.

2. Стабилизирующие продукты определяли во всей коацерватной системе, в равновесной жидкости и во фракции, соответствующей каплям. Измерение окисленных продуктов проводили также в индивидуальных коацерватных каплях.

3. Структуру коацерватных капель изучали при разной ионной силе и в электронном микроскопе.

II. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Препараты и методы

1. ДНК - препарат английской фирмы ВДН.
2. Гуммиарабик - препарат немецкой фирмы Merck.
3. Гистон. Препарат гистона выделен нами из свежемороженой зобной железы телят по методу Хнилицы Л. (Hnilica L. 1959). Содержание белкового азота в препарате в пересчете на сухой вес составляло 16%.
4. Белковый азот определяли по методу Кьельдаля.
5. Фермент полифенолоксидаза (I.IO.3.I) - кристаллический препарат английской фирмы ВДН.
6. Фермент пероксидаза. Препарат фермента пероксидазы (I.II.I.7) был получен из корней хрена по модифицированному нами методу Мили А. (Maehly A.C. 1955.) и лиофильно высушен. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле установлено наличие 3-х изоферментов пероксидазы при pH = 8,9.
7. Содержание белка в препарате фермента определяли по методу Лоури.
8. Субстраты для ферментов: пирокатехин, о-дианизидин, пирогаллол-препараты английской фирмы ВДН, l-тирозин - препарат лаборатории по производству аминокислотных препаратов. Институт медицинской и биологической химии АН СССР.
9. Активность фермента полифенолоксидазы определяли по тирозину спектрофотометрически на СФ-4 при длине волны $\lambda = 280$ нм.
За единицу активности фермента принимали увеличение оптического поглощения на 0,001 Е за 1 минуту при 25°C (Международный стандарт. Worthington Catalog of Enzymes USA., 1968.). Удельная активность фермента полифенолоксидазы составляла 500 ед/мг.
10. Определение активности фермента пероксидазы проводили двумя методами с помощью двух субстратов: пирогаллола и о-дианизидина спектрофотометрически при длинах волн $\lambda = 420$ нм и $\lambda = 437$ нм соответственно. За единицу пероксидазной активности по о-дианизидину принимали то количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля перекиси водорода за 1 минуту при 20-25°C (Международный

стандарт. Worthington Catalog of Enzyme. New Jersey. U.S.A. 1968 г.). Удельная активность фермента пероксидазы по о-дианизидину составляла 690 ед/мг. За единицу активности пероксидазы по пирогаллолу принимали то количество фермента, которое образует 1 мг пурпурогаллина за 20 секунд при 20°C (в настоящее время наиболее часто применяется метод определения активности фермента пероксидазы по пирогаллолу Enzymes. Seravac Laboratories. South Africa. Cape Town., №5., 1963.) Удельная активность фермента пероксидазы по пирогаллолу составляла 572 ед/мг.

II. Состав коацерватных систем. ферментативные реакции окисления пирокатехина полифенолоксидазой и пирогаллола и о-дианизидина пероксидазой были моделированы в белково-углеводных и белково-нуклеиновых коацерватных системах следующего состава:

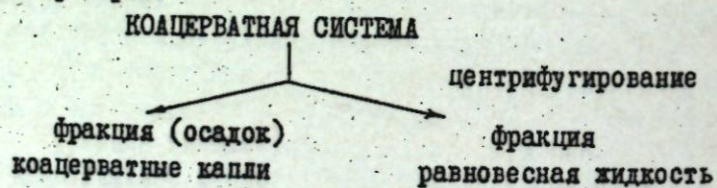
1. ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗА-ПИРОКАТЕХИН-ГУММИАРАБИК-ГИСТОН-ХИНОНЫ (в мл): вода дистиллированная 0,3; ацетатный буфер 0,2 (0,5M; pH=6,0); гуммиарабик 0,5 (0,67%); полифенолоксидаза 0,1 (0,01%); гистон - 0,4 (1%); пирокатехин 0,5 (1%).
2. ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗА-ПИРОКАТЕХИН-ДНК-ГИСТОН-ХИНОНЫ (в мл): вода дистиллированная 0,3; ацетатный буфер 0,2 (0,5 M, pH=6,0); ДНК 0,4 (0,5%); полифенолоксидаза 0,1 (0,01%); гистон 0,5 (1%); пирокатехин 0,5 (1%).
3. ПЕРОКСИДАЗА-ПИРОГАЛЛОЛ-ГУММИАРАБИК-ГИСТОН-ПУРПУРОГАЛЛИН (в мл): вода дистиллированная 0,2; ацетатный буфер 0,2 (0,5M; pH=6,0); гуммиарабик 0,5 (0,67%); пероксидаза 0,1 (0,01%); гистон 0,4 (1%); H₂O₂ 0,2 (0,5%); пирогаллол 0,5 (0,2%).
4. ПЕРОКСИДАЗА-ПИРОГАЛЛОЛ-ДНК-ГИСТОН-ПУРПУРОГАЛЛИН (в мл): вода дистиллированная 0,1; ацетатный буфер 0,2 (0,5 M; pH=6,0) ДНК 0,4 (0,5%); пероксидаза 0,1 (0,01%); гистон 0,5 (1%); H₂O₂ 0,2 (0,5%); пирогаллол 0,5 (0,2%).
5. ПЕРОКСИДАЗА-О-ДИАНИЗИДИН-ГУММИАРАБИК-ГИСТОН-ОКИСЛЕННЫЙ О-ДИАНИЗИДИН (в мл): вода дистиллированная 0,5; ацетатный буфер 0,2 (0,5M; pH=6,0) гуммиарабик 0,5 (0,67%); пероксидаза 0,1 (0,01%); гистон 0,4 (1%); H₂O₂ 0,2 (0,5%) о-дианизидин 0,1 (0,5%).

6. ПЕРОКСИДАЗА-О-ДИАНИЗИДИН-ДНК-ГИСТОН-ОКИСЛЕННЫЙ
 О-ДИАНИЗИДИН (в мл): вода дистиллированная 0,6; ацетатный буфер 0,2 (0,5 М; pH=6,0); ДНК 0,4 (0,5%); пероксидаза 0,1 (0,01%); гистон 0,5 (1%); H₂O₂ 0,2 (0,5%); о-дианизидин 0,1 (0,5%).

Оптимальные концентрации ферментов в коацерватных системах составляли 0,004 мг/мл. Оптимальные концентрации субстратов составляли 2,5 мг/мл для пирокатехина, 0,5 мг/мл для пирогаллола и 0,25 мг/мл для о-дианизидина. Коацерватные капли возникали при сливании растворов в указанной последовательности при $t = 20-25^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH} = 6,0$, которое соответствует оптимальному значению для действия ферментов.

12. Суммарное определение продуктов ферментативного окисления во фракциях коацерватных систем.

Определение продуктов окисления проводили следующим путем. Коацерватную систему разделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3-х минут ($t = 0-+4^{\circ}\text{C}$) на фракцию равновесной жидкости и фракцию коацерватных капель, оседавшую на дно пробирки.



Содержание продуктов окисления во всей коацерватной системе и во фракциях коацерватных систем определяли спектрофотометрически на приборе СФ-4 при тех же длинах волн, как и для определения активности пероксидазы. Продукты окисления пирокатехина определяли при длине волны $\lambda = 410$ нм.

13. Количественное измерение окисленных продуктов в индивидуальных коацерватных каплях.

Определение размеров индивидуальных коацерватных капель и содержание в них окисленных продуктов проводили оптическими методами с помощью приборов: анализатора биочастиц АБ-5, цитоспектрофотометра МУФ-5 и сканирующего интегрирующего микрофотометра СИМ-1. На анализаторе биочастиц АБ-5 был установлен средний размер коацерватных капель, а также распределение капель по размерам в коацерватных системах. Скорость счета

на анализаторе АБ-5 составляет 1000 микрообъектов в секунду. Диапазон исследуемых объектов от 1 мкм до 100 мкм. Ошибка измерений не превышала $\pm 1\%-2\%$.

Зондовый цитоспектрофотометр МУФ-5 был использован нами для определения абсорбционных максимумов и количественного измерения продуктов ферментативного окисления в коацерватных каплях. Ошибка измерений не превышала 3-4%. Фотометрирование капель и запись по линиям спектра проводились в области 250-700 нм.

На рисунке I представлен абсорбционный спектр коацерватной системы: Пероксидаза - Пирогаллол - Гуммиарабик - Гистон - Пурпурогаллин.

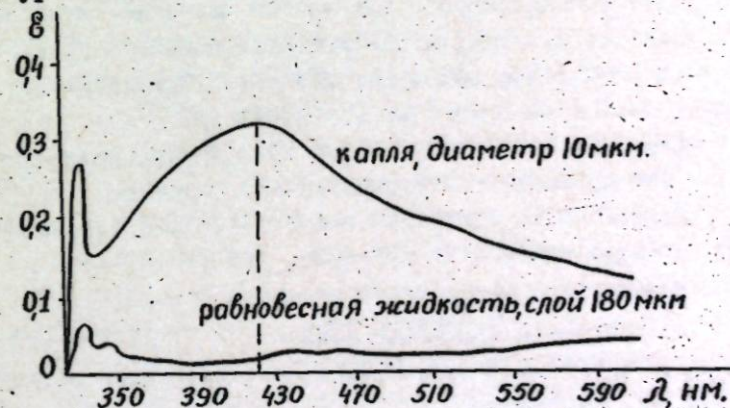


Рис. I - Абсорбционный спектр коацерватной системы: Пероксидаза - Пирогаллол - Гуммиарабик - Гистон - Пурпурогаллин.

По абсорбционному спектру определяли максимум поглощения света коацерватной каплей и ее оптическую плотность. Так, на основе анализа абсорбционных спектров было установлено, что продукты окисления пирокатехина, содержащиеся в каплях, имеют максимум поглощения света в области 400-410 нм, пурпурогаллин - в области 415-420 нм, окисленный о-дианизидин - в области 435-440 нм. Принимая, что коацерватная капля имеет правильную шаровидную форму, и зная ее диаметр и оптическую плотность, рассчитывали концентрацию в ней окисленных продуктов по закону Ламберта-Бугера-Бера. Содержание в капле

окисленных соединений в граммах вычисляли по формуле:

$$P = C \cdot V, \text{ где}$$

P - количество окисленных продуктов (г)
 C - концентрация продуктов (г/см³)
 V - объём капли (см³).

Для определения содержания продуктов ферментативного окисления в индивидуальных каплях использовали также экспериментальную установку СИМ-1 - сканирующий интегрирующий микрофотометр, состоящий из сканирующего микроскопа (СМ) и специализированной вычислительной машины (СВМ). Микрофотометр СИМ-1 позволил быстро и с высокой точностью определить по оптической плотности количество вещества, площадь и диаметр коацерватных капель. Оптическую плотность измеряли при максимальной длине волны для продуктов ферментативного окисления. Ошибка измерений не превышала 3%.

14. Для обработки экспериментальных данных были использованы методы математической статистики.

15. Исследование структуры коацерватных капель проводили в электронном микроскопе УЭМ-100-В при увеличениях от 4800 до 50000.

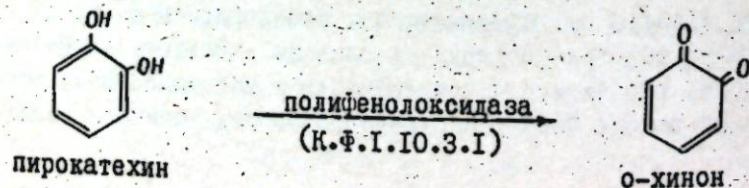
II. РЕЗУЛЬТАТЫ

I. Моделирование ферментативных окислительных реакций в коацерватных системах.

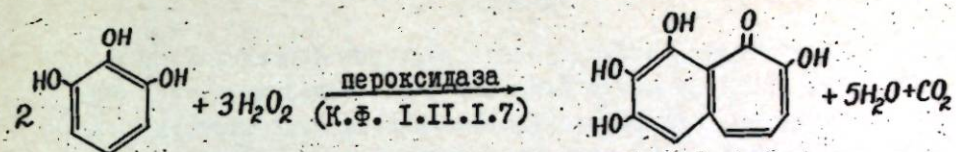
В белково-углеводных коацерватных системах, состоящих из гистона и гуммиарабика, и в белково-нуклеиновых коацерватных системах, состоящих из гистона и ДНК, были моделированы ферментативные реакции окисления пирокатехина полифенолоксидазой (I.IO.3.I), пирогаллола и о-дианизидина пероксидазой (I.II.I.7) в присутствии перекиси водорода при pH=6,0 и температуре t = 20-25°C.

Ферментативные окислительные реакции протекали в коацерватных системах согласно следующим уравнениям:

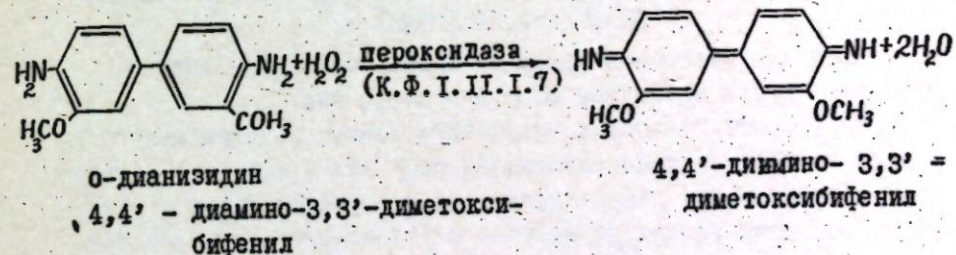
Уравнение I



Уравнение 2



уравнение 3



В результате ферментативных реакций в коацерватных системах образуются окисленные продукты, которые концентрируются в каплях и придают им значительную устойчивость. Установлено, что стабилизировать коацерватные капли способны только окисленные субстраты. Мы предполагаем, что окисленные соединения образуют шивки между молекулами полимеров, входящих в состав капель. Полученные стабилизированные коацерватные капли отличаются от всех известных до сих пор коацерватных капель: оседая на дно пробирки они не сливаются друг с другом и могут сохранять свою индивидуальную структуру в течение длительного времени - до 4-х лет и дольше. Необходимо было установить, какое количество продуктов ферментативного окисления приводит к стабилизации коацерватных капель. Для этого действие ферментов в коацерватных каплях изучали в зависимости от концентрации ферментов, субстратов, их химической природы и продолжительности реакции.

2. Распределение продуктов окисления в коацерватных системах

При изучении распределения продуктов ферментативного окисления между фракцией капель и равновесной жидкостью было установлено, что окисленные соединения концентрируются в основном в каплях. На рисунке 2 показано, что концентрация окисленных субстратов в каплях в 5-15 раз выше, чем в равновесной жидкости (в пересчете на 1 мл объема). Суммарный объем капель в 20 раз меньше объема всей коацерватной системы.

3. Измерение окисленных продуктов в индивидуальных коацерватных каплях

Продукты окисления измеряли более чем в 5000 индивидуальных каплях диаметром от 2 мкм до 10 мкм.

Результаты обработки полученных данных методом математической статистики представлены на рисунках 3,4,5,6 и в уравнениях I-УШ. Часть результатов дана в таблицах № 1 и № 2. Из данных этих таблиц видно, что с увеличением размеров капель содержание в них окисленных соединений возрастает, а концентрация снижается. Из рисунков 3,4,5,6 и уравнений I-УШ следует, что изменение содержания продуктов ферментативного окисления в каплях при увеличении их размеров подчиняется параболической зависимости, которая выражается уравнением общего вида:

$$y = a + vx + cx^2, \text{ где}$$

y - количество продуктов окисления в капле, 10^{-12} г
 x - объем коацерватной капли, 10^{-12} см³
 a, v, c - соответствующие коэффициенты уравнения.

Между концентрацией окисленных соединений и размером капель существует гиперболическая зависимость, которая выражается уравнением следующего вида:

$$y = a + vx + \frac{c}{x}, \text{ где}$$

y - концентрация продуктов окисления, %
 x - объем капли, 10^{-12} см³
 a, v, c - соответствующие коэффициенты уравнения.

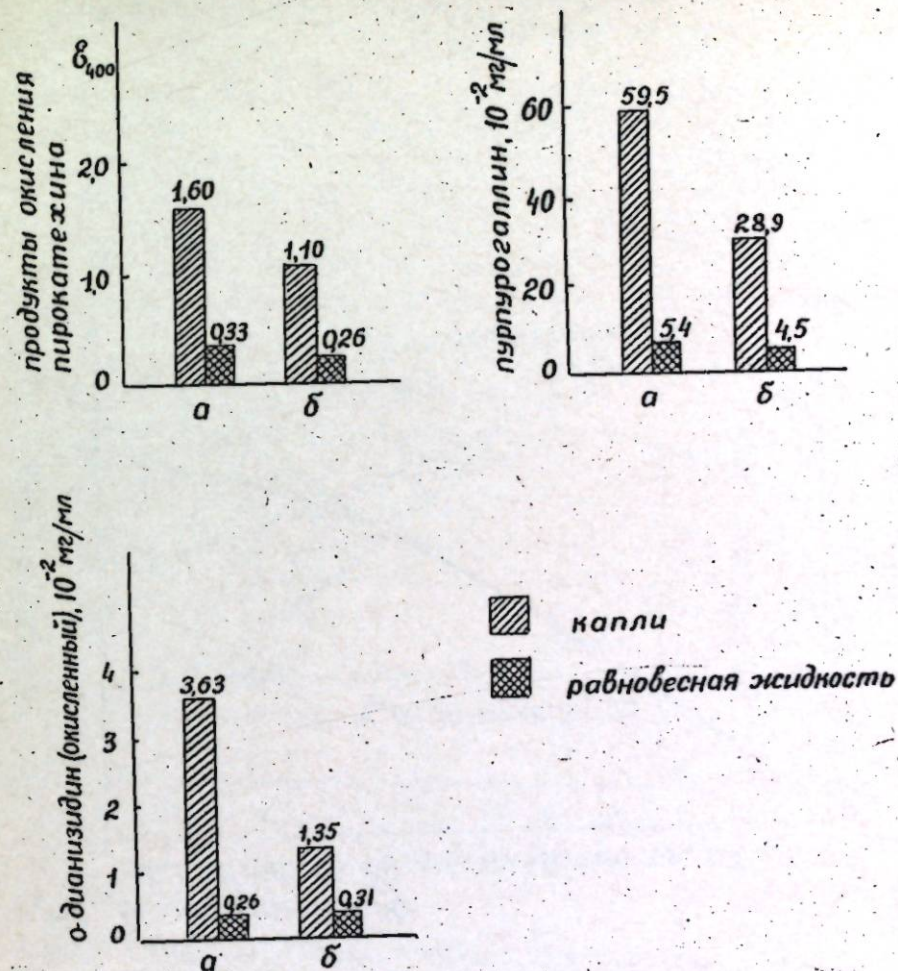


Рис.2 - Распределение продуктов ферментативного окисления в коацерватных системах (на 1 мл) из а) гуммиарабика и гистона б) ДНК и гистона

Пероксидаза-Пирогаллол-Гуммиарабик-Гистон-Пурпурогаллин
(рН = 6,0)

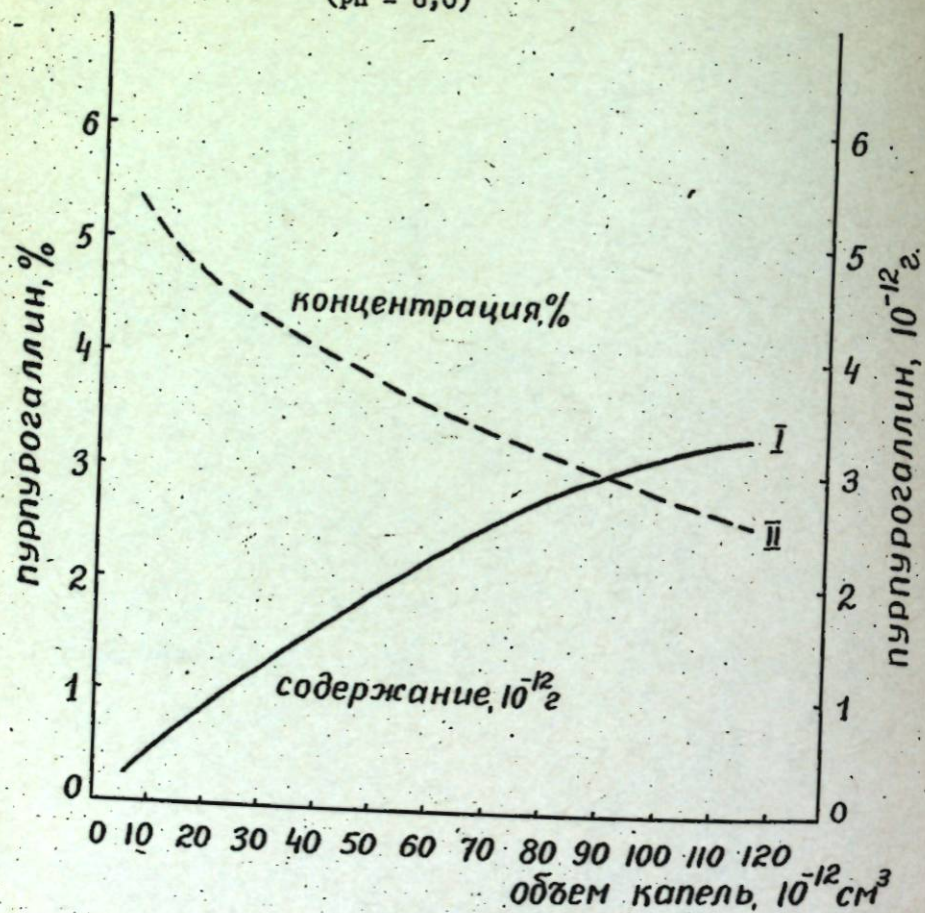


Рис.3 - Содержание и концентрация пурпурогаллина в коацерватных каплях.

$$y = -0,089 + 0,050x - 0,00017x^2 \quad (I)$$

y - количество пурпурогаллина в капле, 10^{-12} г

x - объем капли, 10^{-12} см³

$$y' = 4,805 - 0,019x + \frac{4,6}{x} \quad (II)$$

y' - концентрация пурпурогаллина в капле, %

x - объем капли, 10^{-12} см³

Пероксидаза-Пирогаллол-ДНК-Гистон-Пурпурогаллин (рН=6,0)

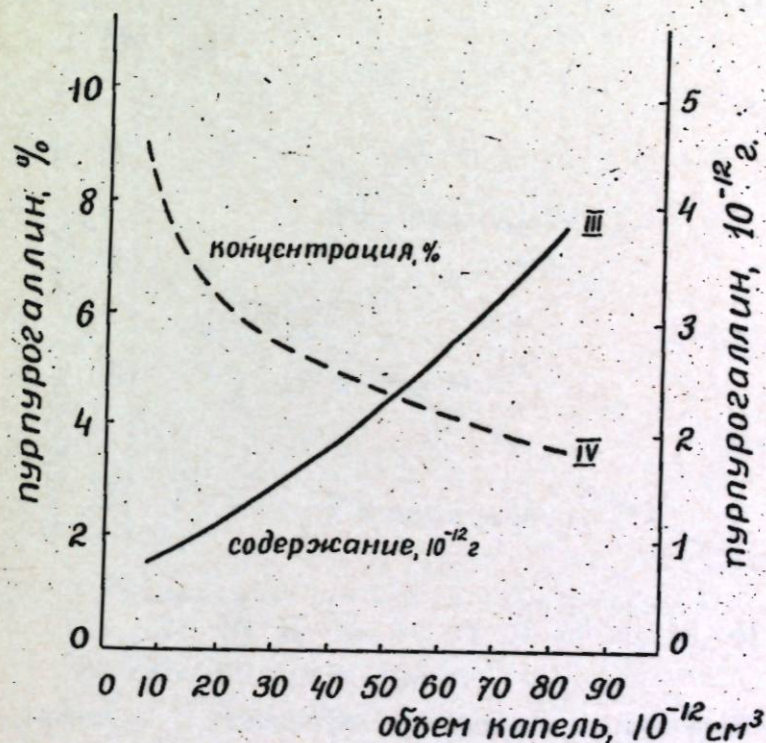


Рис.4 - Содержание и концентрация пурпурогаллина в коацерватных каплях

$$y = 0,634 + 0,023x + 0,0002x^2 \quad (III)$$

y - количество пурпурогаллина в капле, 10^{-12} г

x - объем капли, 10^{-12} см³

$$y' = 5,509 - 0,025x + \frac{29,142}{x} \quad (IV)$$

y' - концентрация пурпурогаллина, %

x - объем капли, 10^{-12} см³

Пероксидаза-о-Дианизидин-Гуммиарабик-Гистон-Окислен-
ный о - дианизидин (рН = 6,0)

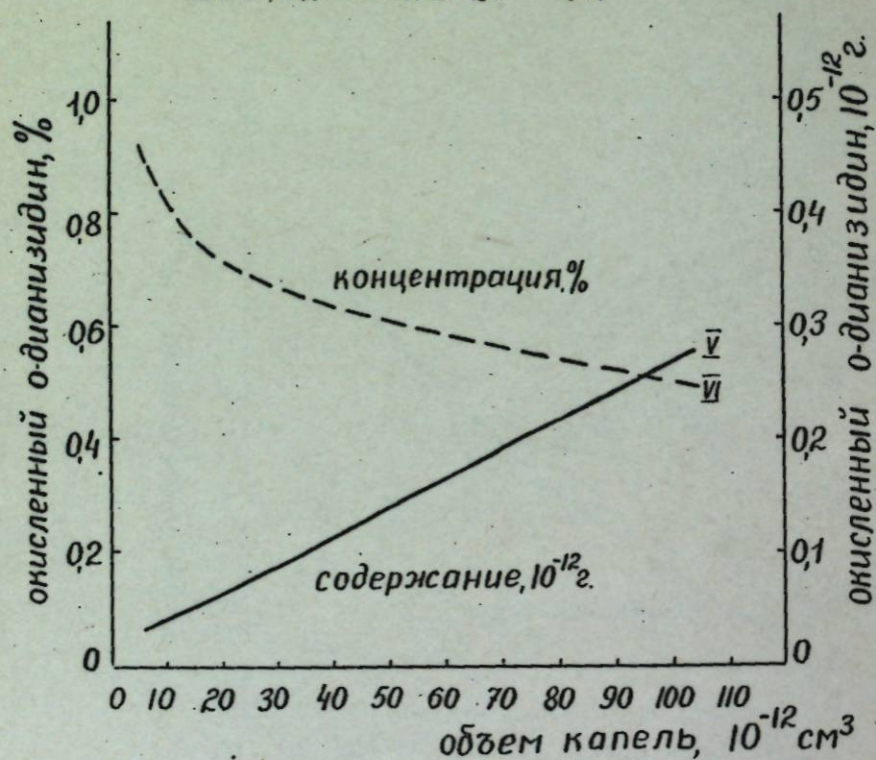


Рис.5 - Содержание и концентрация окисленного о-дианизидина в коацерватных каплях.

$$y = 0,054 + 0,005x - 0,0000005x^2 \quad (V)$$

y - количество окисленного о-дианизидина в капле, 10^{-12} г
x - объем капли, 10^{-12} см³

$$y' = 0,712 - 0,002x + \frac{1,263}{x} \quad (VI)$$

y' - концентрация окисленного о-дианизидина, %
x - объем капли, 10^{-12} см³

Пероксидаза-о-Дианизидин-ДНК-Гистон-Окисленный о-дианизидин
(рН = 6,0)

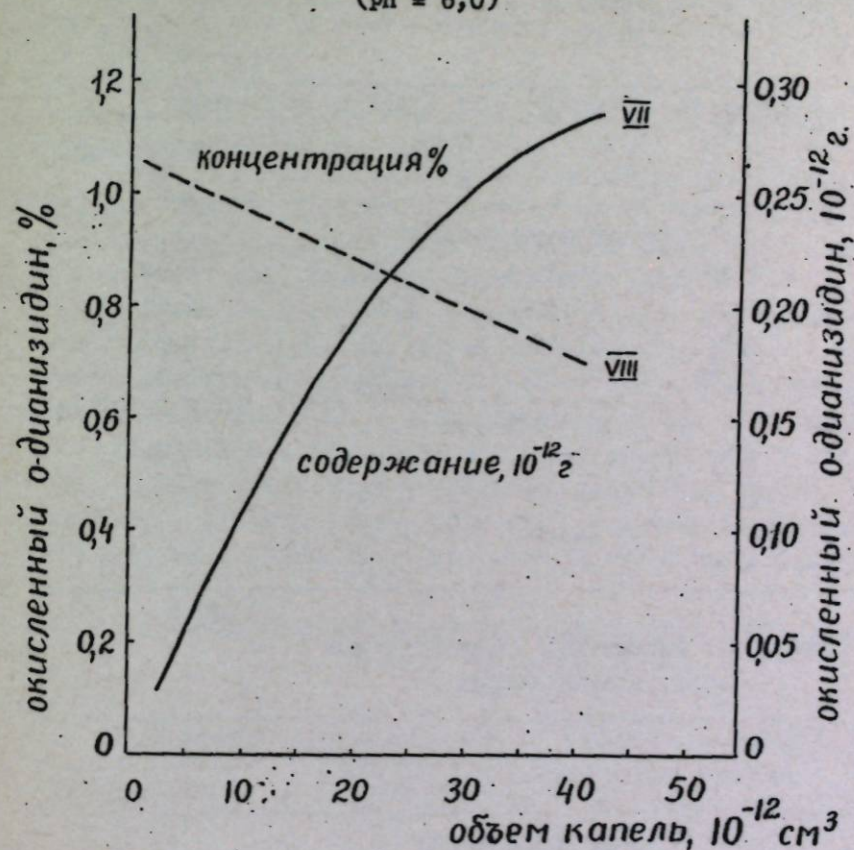


Рис.6 - Содержание и концентрация окисленного о-дианизидина в коацерватных каплях.

$$y = -0,001 + 0,012x - 0,00012x^2 \quad (VII)$$

y - количество окисленного о-дианизидина в капле, 10^{-12} г
x - объем капли, 10^{-12} см³

$$y' = 1,093 - 0,009x - \frac{0,014}{x} \quad (VIII)$$

y' - концентрация окисленного о-дианизидина, %
x - объем капли, 10^{-12} см³

Таблица 1

Содержание пурпурогаллина в индивидуальных каплях

№ капли	Диаметр 10^{-4} см	Объём 10^{-12} см ³	Пурпурогаллин	
			Вес 10^{-12} г	концентрация, %
Гуммиарабик-Гистон				
1	4,20	39,01	1,60	4,10
2	4,40	44,60	1,80	4,04
3	4,74	55,90	2,17	3,89
4	5,27	76,81	2,75	3,56
ДНК - Гистон				
5	2,81	11,71	0,93	7,93
6	2,84	12,09	0,94	7,78
7	3,01	14,36	1,00	6,99
8	4,81	58,42	2,66	4,55

Таблица 2

Содержание окисленного о-дианизидина в индивидуальных каплях

№ капли	Диаметр 10^{-4} см	Объём 10^{-12} см ³	о-дианизидин (окисленный)	
			Вес 10^{-12} г	Концентрация, %
Гуммиарабик-Гистон				
1	3,67	25,88	0,183	0,70
2	3,99	33,31	0,220	0,66
3	4,81	58,34	0,344	0,59
4	5,45	84,85	0,474	0,59
ДНК - Гистон				
5	3,48	22,18	0,206	0,91
6	3,88	30,77	0,254	0,82
7	3,99	33,31	0,265	0,79
8	4,23	39,68	0,286	0,72

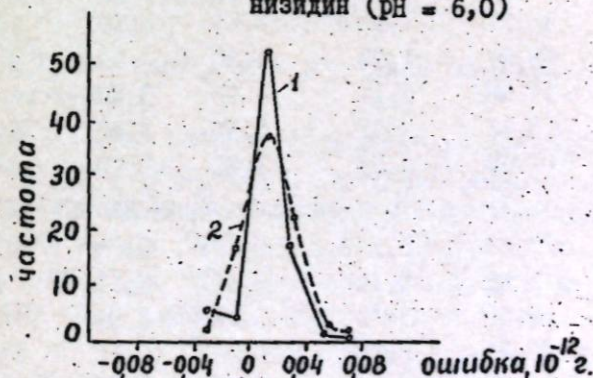
Благодаря этим уравнениям и графикам без многочисленных экспериментальных измерений можно рассчитать количество и концентрацию продуктов ферментативного окисления для капель различного размера.

4. Определение коэффициента корреляции и распределение ошибок

Были рассчитаны коэффициенты корреляции между экспериментальными данными и данными, полученными по уравнениям. Коэффициенты корреляции указывают на сильную корреляцию и свидетельствуют о достоверности полученных результатов.

В качестве примера на рисунке 7 приведено распределение ошибок для коацерватной системы Пероксидаза-о-дианизидин-ДНК-Гистон-Окисленный о-дианизидин. Значение критерия соответствия хи-квадрат (χ^2) во всех случаях показало, что эмпирическое распределение ошибок отличается от нормального и представляет положительный эксцесс. Основное количество ошибок, расположенных в центре, имеет абсолютную величину близкую к нулю, что указывает на значительную точность экспериментальных измерений.

Пероксидаза-о-Дианизидин-ДНК-Гистон-Окисленный о-дианизидин (рН = 6,0)



1 - эмпирическое распределение
2 - нормальное распределение

Рис. 7 - Распределение ошибок (расчет содержания окисленного о-дианизидина проводился по объему капель).
средняя арифметическая ошибка $M = 0,0121 \cdot 10^{-12}$
среднее квадратическое отклонение $\sigma = 0,0773 \cdot 10^{-12}$
критерий хи-квадрат $\chi^2 = 24,8$ {7,8; 11,3; 16,3}



5. Влияние химического состава капель на содержание окисленных соединений

При сравнении белково-углеводных и белково-нуклеиновых коацерватных капель было установлено, что химический состав коацерватных капель может влиять на количество концентрируемого вещества. В таблице 3 показано, что содержание и концентрация продуктов ферментативного окисления выше в каплях, состоящих из ДНК и гистона, чем в каплях из гуммиарабика и гистона. Следовательно, белково-нуклеиновые коацерватные капли обладают несколько большей способностью концентрировать продукты окисления.

Таблица 3
Содержание продуктов окисления в каплях разных систем

№ капли	Диаметр 10^{-4} см	Объем 10^{-12} см ³	Гуммиара-	ДНК	Гуммиа-	ДНК-
			бик-Гис- тон	: Гистон	рабик- Гистон	: Гистон
			10^{-12} г		%	
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

6. Структура коацерватных капель

а) Влияние ионной силы раствора на коацерватные капли.

Белково-углеводные и белково-нуклеиновые коацерватные капли были получены при оптимальной ионной силе ацетатного буфера pH=6,0 в коацерватной системе $\mu = 0,05$.

В обычном микроскопе стабилизированные коацерватные капли представляют собой шаровидные образования равномерно окрашенные окисленными соединениями в желто-коричневый цвет. При повышении ионной силы раствора до $\mu = 0,25-0,35$, при которой обычные коацерватные капли растворяются, в стабилизированных каплях происходит перераспределение молекул биополимеров. Возникают структурированные коацерватные капли с многочисленными вакуолями и скоплениями молекул. Структурированные коацерватные капли также могут сохраняться длительное время, не разрушаясь.

На рис. 8 представлено влияние ионной силы на устойчивые коацерватные капли.

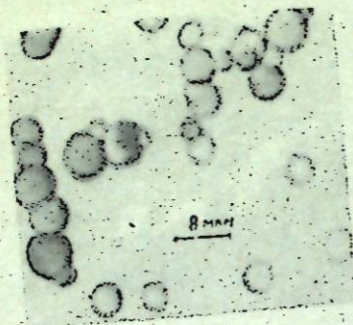
б) Исследование коацерватных капель в электронном микроскопе

Изучена внутренняя структура стабилизированных коацерватных капель.

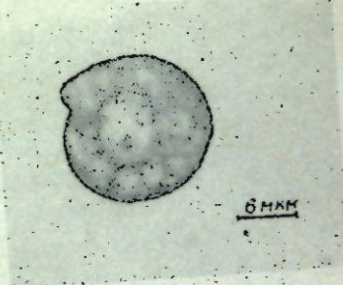
На основе анализа электронномикроскопических фотографий стабилизированных капель было установлено, что капли имеют четкие поверхностные слои различного строения: с многочисленными выступами, "липами" и перетяжками. В то же время коацерватные капли из гистона и ДНК, не содержащие окисленных субстратов, имеют расплывчатые, рыхлые края и, как правило, сливаются друг с другом, образуя бесформенную массу. Стабилизированные коацерватные капли, объединяясь в колонии, не сливаются друг с другом. В колониях капли соединены вместе с помощью перетяжек и зубчиков поверхностных слоев.

Возникновение колоний, как нам кажется, является весьма важным этапом эволюции предклеточных структур на пути к жизни.

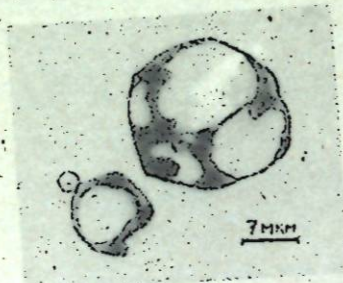
Пероксидаза-Пирогаллол-Гуммиарабик-Гистон-Пурпурогаллин
(pH = 6,0)



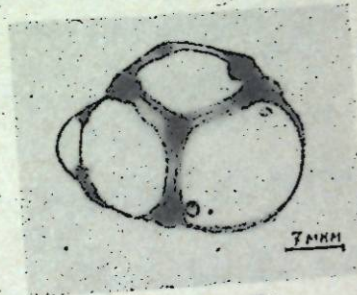
$M = 0,07$



$M = 0,23$



$M = 0,27$



$M = 0,32$

Рис.8 - Влияние ионной силы на коацерватные капли
Внутренняя структура капель очень сложна и требует дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Получено 6 новых стабильных белково-углеводных и белково-нуклеиновых коацерватных систем с участием окислительных ферментов.

В этих системах моделированы следующие ферментативные реакции: окисление пирокатехина полифенолоксидазой и окисление пирогаллола и о-дианизидина пероксидазой в присутствии H_2O_2 .

2. Продукты реакции - хиноны и окисленный о-дианизидин концентрируются в каплях и стабилизируют их. Благодаря этому капли приобретают новые свойства. Они не сливаются и сохраняют свою индивидуальную структуру в течение 4-х лет, а возможно и дольше. Во всех известных до сих пор коацерватных системах капли сливались, образуя слои.

3. С увеличением размеров коацерватных капель содержание в них продуктов ферментативного окисления возрастает, а концентрация снижается.

4. Для исследованных коацерватных систем выведено 24 математических уравнения, выражающих зависимость между содержанием, а также концентрацией продуктов ферментативного окисления и размером коацерватных капель.

5. Стабилизированные коацерватные капли образуют колонии. Методом электронной микроскопии показано, что капли имеют четкие поверхностные слои различного строения и соединяются между собой за счет перетяжек и выступов поверхностных слоев.

6. Полученные в работе данные расширяют возможности использования коацерватных систем как предклеточных моделей, и для исследования действия ферментов в таких системах.

Опубликованные работы по материалам диссертации

1. Евреинова Т.Н., Мамонтова Т.В., Гарбер М.М., Карнаухов В.Н. Окислительные ферменты в коацерватных системах. Второй Всесоюзный Биохимический съезд. Ташкент, Октябрь. Тезисы докладов на симпозиумах. Изд-ва ФАН, Узбекская ССР, 1969, 15.
2. Евреинова Т.Н., Мамонтова Т.В., Гарбер М.М., Карнаухов В.Н., Дудаев А.Н. Окислительные ферменты и стабилизация капель в коацерватных системах. Ж.эвол.биох.и физиол.т.7, № 1, 1971, 23.
3. Евреинова Т.Н., Мамонтова Т.В., Литинская Л.Л., Хруст Д.Р., Действие ферментов в коацерватных системах. Пероксидаза и стабилизация коацерватных капель. ДАН СССР, 204, № 4, 991, 1972.

4. Мамонтова Т.В., Евреинова Т.Н. Действие пероксидазы в коацерватных системах. Биол.науки, № 5, 98, 1972.
5. Евреинова Т.Н., Мамонтова Т.В., Карнаухов В.Н., Литинская Л.Л., Хруст У.Р., Дудаев А.Н., Иваницкий Т.Р.
Применение машинного анализа для исследования коацерватных систем. Труды IV Международного биофизического конгресса. СССР, Москва, 7-14 августа, т.4, 478, 1972.
6. Евреинова Т.Н., Стефанов С.Б., Мамонтова Т.В. Структура коацерватных капель в электронном микроскопе.
ДАН СССР, 208, № 1, 1973.
7. Evreinova T.N., Mamontova T.W., Karnaukhov W.N., Dudaev A.N.
Oxidoreductases and the stability of coacervate drops.
Molecular Evolution 1. Chemical evolution and the origin of life. Conference of the origin of life.
Ed. by Buvet R. and Ponnampertuma C. Amsterdam-London.
North-Holland-Publishing-Company. p.337., 1971.
8. Evreinova T.N., Mamontova T.W., Karnaukhov W.N., Ivanizki G.R.
The Interaction of Biological Macromolecules in Coacervate Systems, J. Colloid and Interface Science. 36., 18., 1971.
9. Evreinova T.N., Mamontova T.W., Karnaukhov W.N.,
Coacervate systems and evolution of matter on the Earth. Molecular Evolution. Prebiological and Biological. Ed. by Mr. Seymour Weingarten. Plenum Publishing Corporation. New York. p.361., 1972.
10. Evreinova T.N., Mamontova T.W., Karnaukhov W.N., Stefanov S.B., Khrust U.R.
Coacervate systems and origin of life.
4. International Conference on the origin of life.
Abstracts, 23., Spain, Barcelona, June 25-28, 1973

Основные результаты работы докладывались:

1. На "научной конференции молодых ученых, посвященной 50-летию ВЛКСМ", Москва, МГУ, 1968.
2. На Втором Всесоюзном Биохимическом съезде. Ташкент, октябрь, 1969.
3. На III Международном симпозиуме по происхождению жизни. Франция, Париж, апрель 20-27, 1970.
4. На IV конференции молодых ученых, посвященной XXIV съезду Коммунистической партии Советского Союза. Москва, МГУ, 1971.
5. На X Международном симпозиуме "Происхождение жизни и эволюционная биохимия". Болгария. Варна, сентябрь 18-19 1971.
6. На Конференции молодых ученых, посвященной 50-летию образования Союза Советских Социалистических республик. Москва, МГУ, 1972.
7. На IV Международном биофизическом конгрессе. Москва, август 7-14, 1972.
8. На 4-й Международной конференции "Происхождение жизни". IV Коллоквиум. Испания, Барселона, июнь 25-28, 1973.

ПОДП. К ПЕЧАТИ 29/Х1-73 Г. ФОРМАТ 60x90/16
ФІЗ.П.Л. 1,5. УЧ.-ИЗД.Л. 1,0. ЗАКАЗ 2342. ТИР. 200

ОТПЕЧАТАНО НА РОТАПРИНТАХ В ТИП. ИЗД. МГУ
МОСКВА, ЛЕНГОРЫ