

МИКРОБИОЛОГИЯ

А. Е. КРИСС и А. С. ТИХОНЕНКО

**РАСКРУЧИВАНИЕ СПИРАЛИ, ОБРАЗУЮЩЕЙ ГОЛОВКУ
БАКТЕРИОФАГА, ПОД ВЛИЯНИЕМ ВЫСОКИХ ДАВЛЕНИЙ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 IX 1953)

Электронно-микроскопические исследования строения корпускула бактериофага позволили установить ⁽²⁾, что характерная сперматозоидоподобная фигура его образована спиралевидно свернутой цепью шаровидных макромолекул белка. В отличие от мышечного белка — актина, надмолекулярная структура которого, как известно, представляет линейный тип агрегации глобулярных белков, структура корпускула фага представляет спиралевидный тип агрегации глобулярных белков.

На оптимально напыленных препаратах бактериофага, когда контрастирование металлом не закрывает, а, наоборот, оттеняет тонкие детали строения частицы фага, в электронном микроскопе видно, что закрученная наподобие улитки нить, являющаяся цепью тесно прилегающих друг к другу шариков, составляет головку фага, а свободный конец этой цепи, отходящий в виде касательной или перегибаясь под прямым углом, — хвост его.

Казалось небезинтересным для дальнейшего изучения строения надмолекулярных белковых структур попытаться осуществить раскручивание головки фага, превращение этого спиралевидного агрегата в линейный агрегат глобулярных белков.

С этой целью были применены два агента: химический — мочевины, обладающая выраженным денатурирующим действием, и физический — высокое давление, способствующее реакциям, идущим с уменьшением объема.

Опыты проводились с бактериофагом к спороносной палочке *Vac. typhimurium*, на примере которого удалось убедиться ⁽²⁾, что своеобразный вид фагового корпускула обусловлен спиральным закручиванием длинной цепочки глобулярных белковых макромолекул. Не вдаваясь в подробности описания экспериментов с мочевиной, укажем только, что прибавление ее к бульонному фаголизату в концентрации 36% на срок 2,5, 3, 24 часа с последующим диализом этих смесей в течение 24 час. приводило к полному исчезновению литической активности фаголизата.

В поле зрения электронного микроскопа в препаратах, приготовленных после диализа смеси фаголизата и мочевины, наблюдалось большое количество мелких зерен, равных по размерам шаровидным элементам, из которых составлен фаговый корпускул, или более крупных (рис. 1 а на вклейке). Создается впечатление, что под влиянием мочевины происходит дезагрегация цепи глобул. Это впечатление усиливается еще тем, что в препаратах среди множества зерен изредка встречаются образования, напоминающие отделившиеся от хвостов головки фага, очень неясной конфигурации, словно зафиксированные на стадии начинающе-

гося распада. В фаголизатах, к которым не прибавлялась мочевины, служивших одним из контролей, после диализа, проводившегося в тех же условиях, как и в опытных сериях, корпускулы фага имели обычный вид (рис. 1 б). Следует отметить, что в другом контроле, которым являлся чистый бульон + мочевины, после диализа также встречались зерна различной величины. Возможно, что они являлись результатом дезагрегации белков бульона. Герчик и Градечная (3) наблюдали в электронном микроскопе действие очень малых концентраций мочевины на фаголизис кишечной палочки. В присутствии мочевины бактериальный распад представлял собой массу глобул, тесно примыкающих друг к другу. Среди этих агрегатов отсутствовали частицы фага сперматозоидоподобной формы.

Иное открылось взору в электронном микроскопе в препаратах бактериофага, подвергавшихся действию высокого давления — 5000 атм. Опыты с давлением ставились по единой методике, при которой менялась только продолжительность воздействия давления на фаговые частицы. Бульонный фаголизат наливался в стеклянные ампулы с узким отверстием, которые помещались в резиновые мешочки, наполненные тем же фаголизатом. Эти резиновые мешочки с ампулами, туго перевязанные сверху ниткой со всеми предосторожностями, чтобы не оставались в них пузыри воздуха, заключались в канал стальной бомбы, наполненный дистиллированной водой, в котором с помощью стального поршня создавалось гидростатическое давление в 5000 атм. Для поддержания постоянной температуры (26°) в течение всего опыта бомба обогревалась водой, циркулировавшей в специальной «рубашке», соединенной с термостатным устройством. В проведенных исследованиях экспозиция опытов составляла 2,5, 4, 20, 22, 24, 48, 72 и 168 час. После этих сроков пребывания под давлением в 5000 атм бульонные фаголизаты, так же как и контрольные фаголизаты, не подвергавшиеся давлению, очищались по методу капельного диализа (1). Диализ проводился при 27° в течение 24 час. Препараты для электронной микроскопии напылялись хромом на расстоянии 7 см от источника напыления, под углом в 18°. Параллельно с электронно-микроскопическими исследованиями проводились определения литической активности фаголизатов до и после воздействия высоким давлением.

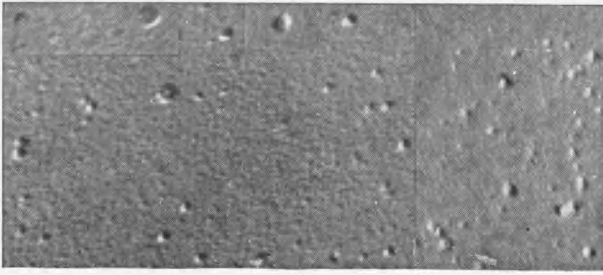
Уже в препаратах бактериофага, пробывших под давлением 4 часа, обнаруживаются нити различной длины (рис. 2 а), однако при этой экспозиции не во всех опытах. Нити — прямые или в отдельных местах слегка изогнутые и искривленные, 16—20 мμ в поперечнике. Наряду с нитями встречаются более толстые, палочковидные элементы, часто образующие причудливые скопления различной величины. Некоторые нити словно продеты через эти палочковидные образования (рис. 2 б). Они могут приходиться на середину нити или располагаются ближе к одному из ее концов. В контролях у сперматозоидоподобных корпускул фага

Рис. 1. Действие мочевины на корпускулы бактериофага. а — дезагрегация корпускул бактериофага под влиянием мочевины; б — контроль, не обработанный мочевиной: корпускулы бактериофага нормального вида

Рис. 2. Раскручивание головки бактериофага при воздействии высоким давлением. а — нити различной длины и скопления толстых палочковидных элементов в препаратах бактериофага, подвергавшихся давлению в 5000 атм в течение 4 час.; б — нити словно продеты через эти палочковидные образования; в — палочковидные образования на хвосте корпускул бактериофага нормального вида, не подвергавшихся давлению; г — начальные стадии раскручивания головки бактериофага под давлением в 5000 атм

Рис. 3. Продолжительное воздействие высокого давления на корпускулы бактериофага. а — очень длинные нити после давления в 5000 атм в течение 72 час.; б — толстые нити — пучки более тонких нитей

Рис. 4. Раскрученная головка бактериофага — цепочка шаровидных элементов. а — зернистое строение нитей; продолжительность давления в 5000 атм 48 и 72 часа; б — дезагрегация нитей на шаровидные элементы; продолжительность давления в 5000 атм — 168 час.



1a



1b



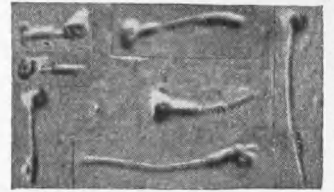
2a



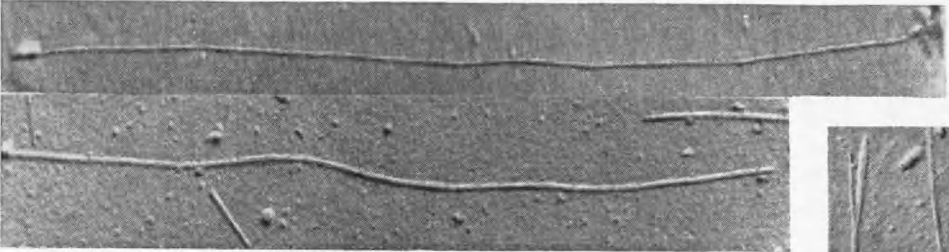
2b



2c



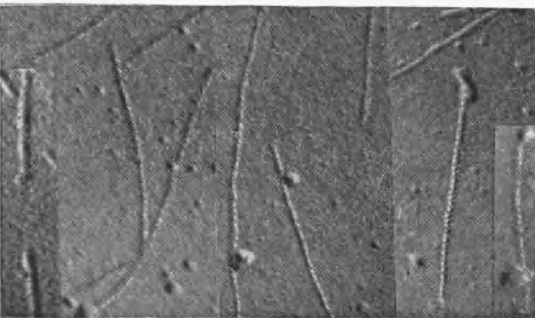
2e



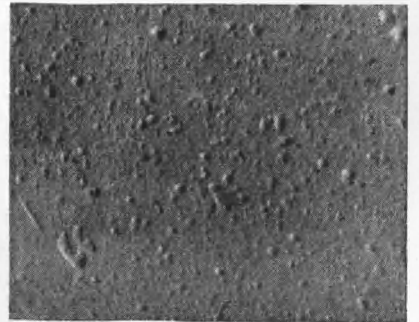
3a



3b



4a



4b

1μ

хвост в поперечнике и по длине имеет те же размеры, что и описываемые палочковидные элементы (рис. 2 в). Продолжением этого толстого хвоста фаговых корпускул нормального вида является тонкая нить, обычно более короткая, чем толстый отрезок хвоста. При отрыве хвоста он имеет вид дубинки.

Под давлением в 5000 атм происходит удлинение тонкой нити хвоста. На рис. 2 г показаны различные стадии этого процесса, которые удалось наблюдать в электронном микроскопе. Создается впечатление, что толстая часть хвоста представляет собой нечто наподобие чехлика, окружающего тонкую нить. При ее удлинении, связанном, очевидно, с раскручиванием спирали, составляющей головку фага, «чехлик» остается сидящим на каком-нибудь участке тонкой нити или совсем сползает. Возможно, что причудливые скопления палочковидных элементов или «чехликов» являются результатом бывшего на этом месте скопления фаговых частиц. О природе этих «чехликов» пока сказать ничего нельзя.

Нити (но сравнительно короткие) выявлены также в препаратах из фаголизатов, находившихся под давлением в 5000 атм в течение 2,5 час. При экспозиции в 48 и 72 часа нити были найдены во всех опытах в больших количествах и значительной длины. Насколько длинными могут быть нити в препаратах бактериофага, подвергавшихся давлению в 5000 атм в течение 72 час., дает представление рис. 3 а. Наряду с этими нитями длиной в 4,4—4,8 μ встречаются и более короткие. Вопрос о том, образуются ли они в результате распада длинных или, наоборот, последние отражают процесс линейной агрегации коротких нитей, требует дальнейших исследований.

Не исключена возможность, что спираль, составляющая головку фага, состоит из большого числа витков, которые при раскручивании могут дать нити, достигающие значительной длины, как на рис. 3 а. Мы убедились в этом на модели, скрутив спирально нитку такой же длины (12 см) и диаметра (0,3 или 0,5 мм). Размер возникшего шарика не превышал среднего размера головки нормального корпускула бактериофага на фотографиях из контрольных препаратов. Число витков составило 25 при диаметре нитки 0,3 мм и 17 при диаметре нитки 0,5 мм.

После 48—72-часовой экспозиции при давлении 5000 атм в препаратах бактериофага обнаруживаются нити толще обычных — до 50 м μ . Как можно судить по рис. 3 б, они, очевидно, являются пучками тонких нитей, тесно прилегающих друг к другу.

Естественно, важно было установить, представляют ли собой тонкие нити, появляющиеся при воздействии высокого давления на корпускулы бактериофага в результате раскручивания их головок — фибриллярные структуры, или они являются цепочкой шаровидных элементов. На фотографиях тех препаратов, где удалось достигнуть тонкого напыления металлом, можно рассмотреть зернистое строение нитей, заметное благодаря тому, что каждый шарик имеет свою «тень» (рис. 4 а).

Повидимому, под влиянием высокого давления происходит развертывание спиралевидного агрегата шаровидных макромолекул белка, переход его в линейный тип агрегации без видимых изменений в форме составляющих этот агрегат глобулярных белков. Согласно предположению П. В. Афанасьева, это раскручивание спирали под влиянием высоких давлений может происходить в результате гидратации глобул фага, процесса, идущего с уменьшением объема всей системы (раствора бактериофага).

Эти изменения бактериофага сопровождаются полной утратой его латентной активности и способности к воспроизведению, но утрата этих свойств наблюдается и после пребывания бактериофага под давлением в 5000 атм в течение 2,5 час., когда наряду с небольшим числом коротких нитей в препаратах встречаются сперматозоидоподобные частицы фага, мало изменившие свою форму по сравнению с контролем.

Очень продолжительное действие высокого давления, например в течение 168 час., приводит к полному исчезновению корпускул фага нормального вида и нитей и к появлению в препаратах множества округлых частиц различной величины (рис. 4 б). Эти шаровидные элементы обнаруживались в большом числе также и после 72-часовой экспозиции опыта, но наряду с ними, как указывалось выше, встречалось много нитей различной длины. Повидимому, эти шаровидные элементы представляют собой результат дезагрегации нитей или, вернее, цепочки глобулярных белков, наступающей в конце концов после длительных воздействий высокого давления.

Лаборатория электронной микроскопии
Отделение биологических наук
Академии наук СССР

Поступило
1 VIII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Крисс, В. Бирюзова, А. Золковер, Микробиология, 17, 484 (1948).
² А. Крисс, А. Тихоненко, ДАН, 86, № 2, 421 (1952). ³ F. Herčík,
Z. Hradečná, Československá Biologie, ročník 1, 2, 85 (1952).