

БИОНАНОСКОПИЯ: БЕЛКИ И ИХ НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

Природа создает основные строительные единицы живых организмов – нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды, другиеnanoструктуры – с точностью, недостижимой в настоящее время человеком в его практической деятельности. Наблюдение биологических объектов – наиболее увлекательное направление сканирующей зондовой микроскопии(СЗМ) [1].

В биологии существенную роль играют не только химический состав, но и форма этих макромолекул. Например, белковая молекула в разных пространственных расположениях может обладать существенно различной ферментативной активностью, причем к ее потере может привести смещение реакционного центра фермента на ничтожные значения. Самые маленькие машины – белки АТФ-синтазы, имеющие неподвижный статор и подвижный ротор, – также объекты живой природы. Линейная плотность записи информации в ДНК или РНК находится в области абсолютных рекордов.

ОДНОЧНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И КОМПЛЕКСЫ

Размеры отдельных белковых молекул сравнимы с радиусом закругления зонда атомно-силового микроскопа (ACM). На белках высокой молекулярной массы удается получать суб-

молекулярное пространственное разрешение, однако разрешить проблему упаковки цепей в небольших белках, например, лизоциме (молекулярная масса 14 кД), до сих пор не удавалось.

Известен ряд работ, где надежно удавалось отличить белковые мономеры от димеров и мультимеров [2]. Зондовую микроскопию можно использовать для регистрации биоспецифического связывания антиген-антитело, поскольку измерения размеров отдельных частиц и достигаемая точность позволяют отделить одиночные антитела и антигены от их комплексов. Зондовая микроскопия обеспечивает также получение информации о характере агрегирования белков и их связывании с нуклеиновыми кислотами. В работе [3], например, по полученным изображениям определен характер связывания транспортного белка с вирусной РНК (рис.2).

КРИСТАЛЛЫ

При исследовании белковых кристаллов в насыщенных растворах проявляется существенное достоинство использования зондовой микроскопии в биологии, а именно,

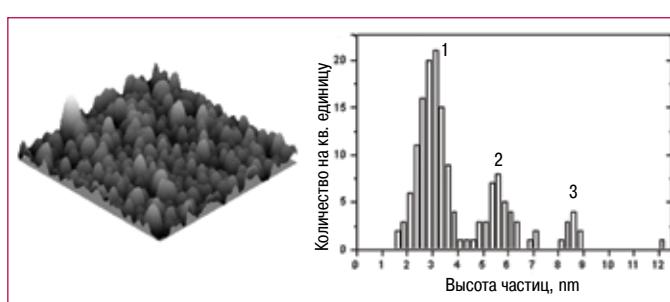


Рис.1 Трехмерное изображение молекул цитохрома Р450 в олигомерной форме, адсорбированных на поверхности слюды. В распределении частиц по высоте присутствует три максимума, соответствующих: 1) мономерным частицам (высота 3 нм), 2) октамерам (высота 5,5 нм) и 3) комплексам из 12–30 белковых молекул (высота около 8,5 нм)

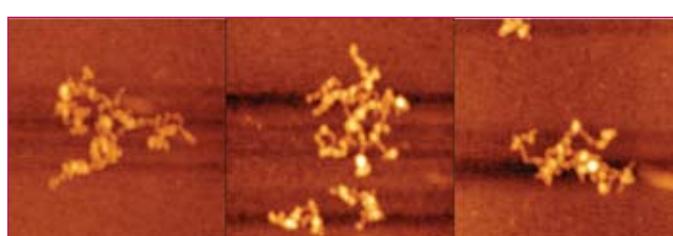


Рис.2 Кооперативное неспецифическое связывание транспортного белка с вирусной РНК

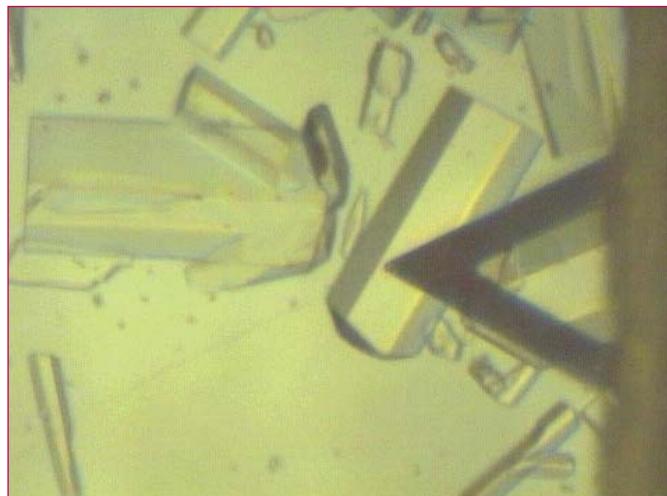


Рис.3 Оптическое изображение растущего кристалла лизоцима и кантилевера (темный треугольник в правой части фотографии) в процессе сканирования поверхности кристалла

возможность наблюдения динамики процессов в естественной для многих биологических объектов жидкой среде (рис.3). Проведенные измерения позволили зарегистрировать кинетику роста дислокационных холмов и двумерных зародышей для многих белковых кристаллов на уровне отдельных молекул или строительных единиц [4, 5]. Например, для кристалла лизоцима были измерены скорости движения ступеней и изломов, вероятность присоединения и отсоединения строительных единиц, зависимость кинетических параметров от различных факторов (температуры, пересыщения и др.) [6].

АСМ микроскопия позволяет наблюдать с молекулярным разрешением структуру поверхности растущего кристалла и изучать упаковку молекул вблизи точечных дефектов, что недоступно для других методов высокого разрешения. Например, в работе [7] было обнаружено явление реконструкции поверхности кристалла, когда упаковка белковых молекул на ней отличается от объемной структуры.

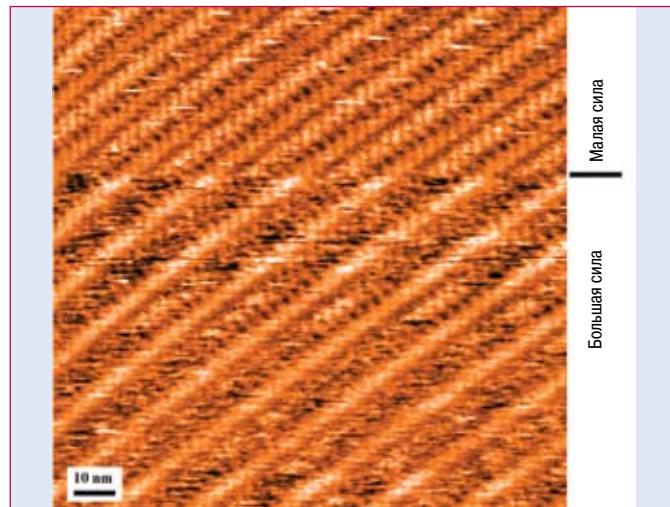


Рис.5 Соседние ряды белковых молекул видны в различном контрасте, который зависит от величины приложенной силы. В объеме эти ряды считаются эквивалентными. Размер кадра 130 x 130 нм². Наблюдения проводились в жидкой среде

Автор выражает благодарность Рособразованию (П255) и Программе "Наука для мира" НАТО (CBN.NR.NRSFP 983204) и РФФИ (10-04-01574-а и 10-02-06030-г).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров / Под ред. И.В. Яминского. – М.: Научный мир, 1997.
2. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy of protein complexes. In "Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications" (Methods in Molecular Biology, v. 242), Ed. by P.C. Braga, D. Ricci. Humana Press, 2003, pp. 217–230.
3. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Karger E.M., Frolova O.Yu., Dorokhov Y.L. and Atabekov J.G. Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro. – Journal of General Virology, 2001, 82, 1503–1508.
4. Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., McPherson A. In situ atomic force microscopy studies of surface morphology, growth kinetics, defect structure and dissolution in macromolecular crystallization – Journal of Crystal Growth, 1999, 196, 471–488.
5. Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., Glantz W., McPherson A. Atomic force microscopy studies of surface morphology and growth kinetics in thaumatin crystallization – J. Phys. Chem., 1996, 100 (28), 11736–11743.
6. Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I. and Rashkovich L.N. Atomic Force Microscopy Study of Lysozyme Crystallization. – Crystallography Reports, 2002, v. 47, Suppl. 1, pp. S149–S158.
7. Гвоздев Н.В., Рашкович Л.Н., Яминский И.В. Атомно-силовая микроскопия грани (010) кристаллов ромбического лизоцима. – Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2000, № 8, с. 73–77.

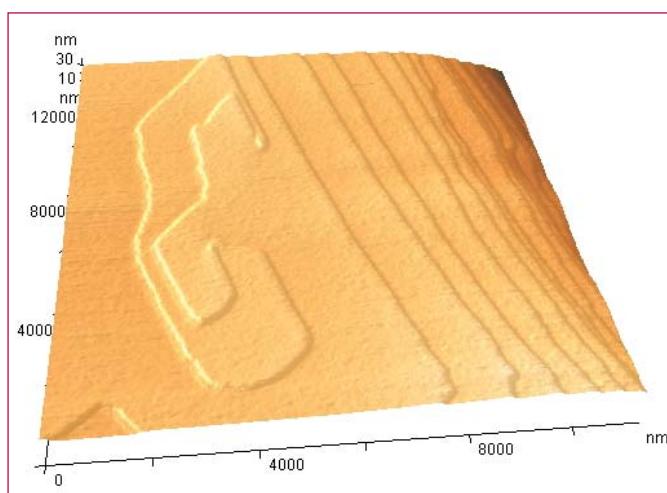


Рис.4 Изображение двухзаходовой винтовой спирали растущего кристалла лизоцима. Наблюдение в насыщенном растворе