

БИОНАНОСКОПИЯ:

БЕЛКИ И ИХ НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

Природа создает основные строительные единицы живых организмов – нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды, другие наноструктуры – 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.

ОДИНОЧНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И КОМПЛЕКСЫ

Размеры отдельных белковых молекул сравнимы с радиусом закругления зонда атомно-силового микроскопа (АСМ). 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 (рис.1) [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).

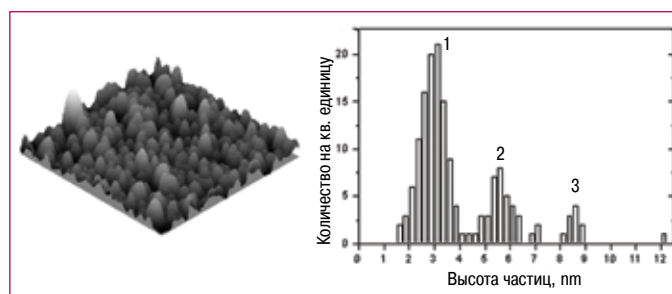


Рис.1 Трехмерное изображение молекул цитохрома Р450 в олигомерной форме, адсорбированных на поверхности слюды. В распределении частиц по высоте присутствует три максимума, соответствующих: 1) мономерным частицам (высота 3 нм), 2) октамерам (высота 5,5 нм) и 3) комплексам из 12–30 белковых молекул (высота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

КРИСТАЛЛЫ

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

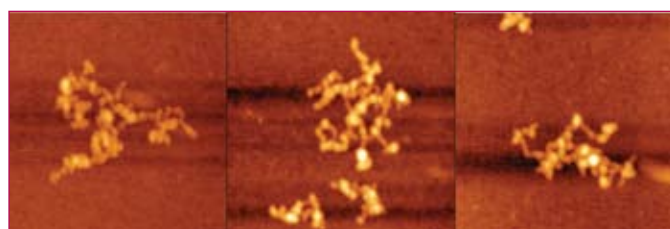


Рис.2 Кооперативное неспецифическое связывание транспортного белка с вирусной РНК

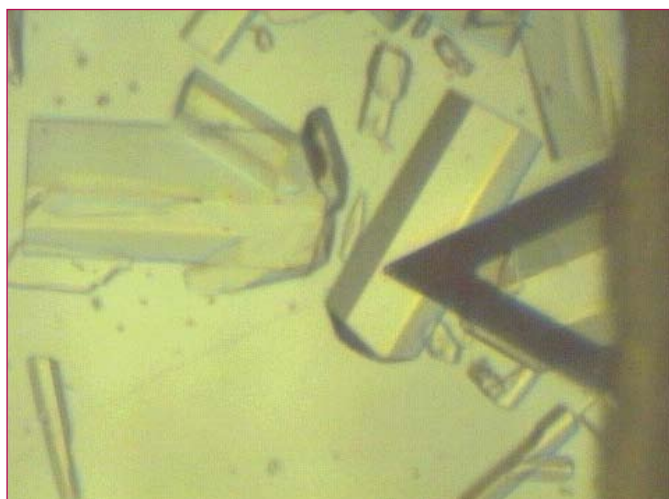


Рис.3 Оптическое изображение растущего кристалла лизоцима и кантилевера (темный треугольник в правой части фотографии) в процессе сканирования поверхности кристалла

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.

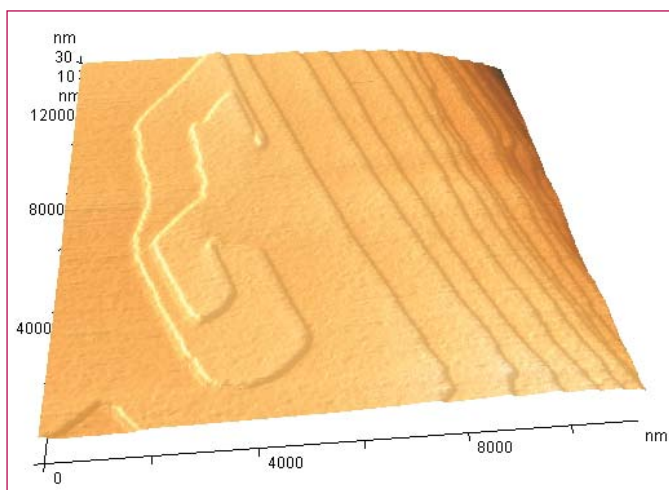


Рис.4 Изображение двухзаходовой винтовой спирали растущего кристалла лизоцима. Наблюдение в насыщенном растворе

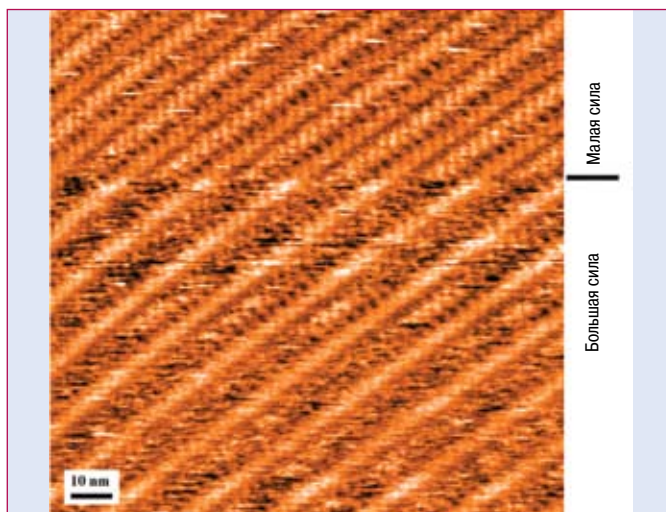


Рис.5 Соседние ряды белковых молекул видны в различном контрасте, который зависит от величины приложенной силы. В объеме эти ряды считаются эквивалентными. Размер кадра $130 \times 130 \text{ nm}^2$. Наблюдения проводились в жидкой среде

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.