

## КАК СОБРАТЬ МЕМБРАНУ (СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ И РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕМБРАН)

Л. И. БАРСУКОВ

*Московский физико-технический институт, Долгопрудный Московской обл.*

### HOW TO ASSEMBLE A MEMBRANE (MEMBRANE SOLUBILIZATION AND RECONSTITUTION)

L. I. BARSUKOV

*A remarkable complexity and heterogeneity of biological membranes require special approaches to their studies. Membrane solubilization and reconstitution enable essential simplification of a system under study by isolation of the most important constituents and subsequent reconstitution in artificial membranes with controlled composition, properties and structural organization. Methodology of the membrane self-assembly on reconstitution is discussed.*

*Исключительная сложность и гетерогенность биологических мембран требуют специальных подходов для их изучения. Методы солюбилизации и реконструкции мембран позволяют существенно упростить изучаемые системы путем выделения из них наиболее важных компонентов и их перевода в искусственные мембраны с контролируемым составом, свойствами и структурной организацией. Рассмотрены методологические аспекты самосборки мембран при реконструкции.*

[journal.issep.rssi.ru](http://journal.issep.rssi.ru)

Пожалуй, сегодня не нужно убеждать кого-либо в том, что исследования биологических мембран представляют собой одно из важнейших направлений современной биологии. Играя ключевую роль в регуляции потоков вещества, энергии и информации в клетке, мембраны вовлечены во все без исключения стороны ее жизнедеятельности. По этой причине внимание многих ученых во всем мире уже давно привлечено к проблемам мембран, и общее число публикаций на эту тему огромно. Статьи, посвященные биологическим мембранам или отдельным внутриклеточным мембранным системам, широко представлены и в данном журнале (см., например: СОЖ. 1996. № 3, 4, 6; 1997. № 1, 3, 5–10; 1998. № 1, 3–6).

Исследования мембран в значительной мере базируются на двух основных методических приемах: это разборка нативной (то есть природной) мембраны на составляющие ее элементы и последующая полная или частичная сборка искусственной мембраны с использованием всех или части компонентов исходной мембраны. Применительно к мембранам эти приемы получили название “солюбилизация” и “реконструкция”, и именно о них пойдет далее речь.

Следует сказать, что разборка изучаемых объектов на составные элементы и их последующая сборка с целью воспроизведения либо всего объекта целиком, либо отдельных его фрагментов, наиболее важных для поддержания структуры и проявления характерных функций, являются излюбленным методом молекулярной биологии клетки. Достаточно вспомнить успешные эксперименты по реконструкции вирусов, рибосом и бактериальных флагелл из входящих в их состав субъединиц, чтобы оценить всю познавательную мощь и информативность этого метода исследования. Еще большее значение этот подход имеет применительно к биологическим мембранам, поскольку они представляют собой чрезвычайно сложные многокомпонентные системы, которые исключительно гетерогенны по своему составу и структурной организации.

Первые усилия по разделению мембран на отдельные функциональные единицы были предприняты в 60-е годы XX в., и в течение долгого времени это направление развивалось эмпирически, по принципу проб и ошибок. Были испытаны различные способы воздействия на мембрану, включая механическую обработку, действие ультразвука, использование органических растворителей и разнообразных химических агентов. Хотя в ряде случаев с помощью этих методов были достигнуты определенные положительные результаты, однако чаще всего такая обработка либо была малоэффективной, либо приводила к деструкции мембранного материала и, что хуже всего, к необратимой денатурации мембранных белков. И только лишь после введения детергентов в практику мембранных исследований был найден тот золотой ключик, с помощью которого удалось раскрыть главные секреты структуры и функций биологических мембран.

## НЕМНОГО О ДЕТЕРГЕНТАХ

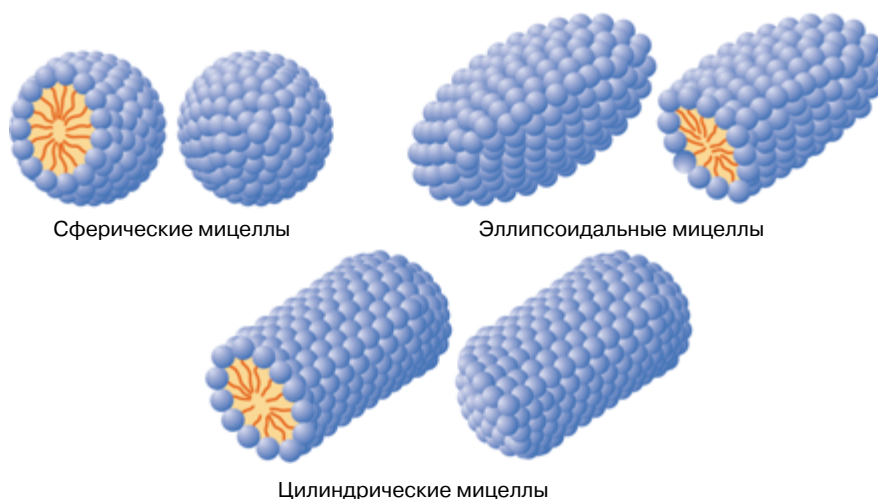
Прежде чем мембрану собрать, надо суметь разобрать ее на составные части. Оказалось, что легче всего это сделать с помощью детергентов.

Детергенты (от лат. *detergere* – мыть, очищать) представляют собой поверхностно-активные вещества с моющим действием, которое обусловлено их способностью образовывать в воде устойчивые коллоидные

растворы. Поверхностная активность детергентов, то есть способность адсорбироваться на границе раздела фаз (типа вода–воздух или вода–масло), связана с амфифильностью их молекул. Амфифильными (от греч. *фило* – любящий и *амфи* – обоих) называют вещества, в молекулах которых имеются четко разграниченные гидрофильные и гидрофобные области, благодаря чему такие молекулы обладают сродством не только по отношению к воде, но и к неполярным органическим растворителям.

В воде молекулы детергентов стремятся ассоциировать друг с другом, давая мицеллы (рис. 1). Эти агрегаты состоят из большого числа детергентных молекул (обычно от нескольких десятков до нескольких сот), ориентированных в мицелле таким образом, что их неполярные группы формируют внутреннее гидрофобное ядро мицеллы, а гидрофильные полярные группировки находятся на ее поверхности и контактируют с окружающими молекулами воды. Именно благодаря наличию гидрофобного ядра мицеллы способны сольubilизировать, то есть переводить в раствор неполярные вещества, практически нерастворимые в воде.

В настоящее время известно несколько сот различных детергентов. Все они разделяются на два основных класса: ионные и неионные детергенты в зависимости от наличия или отсутствия заряженных групп в гидрофильной области их молекул. В свою очередь, по типу заряда ионные детергенты делятся на катионные,



**Рис. 1.** Различные типы мицелл, образуемых детергентами в воде в зависимости от их химического строения, концентрации и условий среды. Сферические мицеллы имеют минимальные размеры (около 4 нм) и обычно существуют в области концентраций, ненамного превышающих ККМ. С ростом концентрации детергента сферические мицеллы переходят в цилиндрические (или палочкообразные) мицеллы, средняя длина которых зависит от концентрации детергента. Эллипсоидальные мицеллы образуют детергенты, у которых соотношение между размерами полярной и неполярной областей молекулы может меняться, а также детергенты в смеси с другими амфифильными соединениями (рисунок из [3])

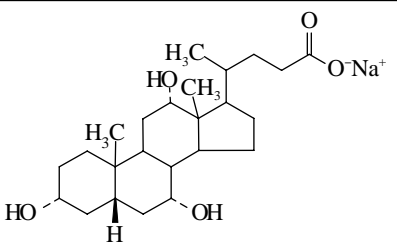
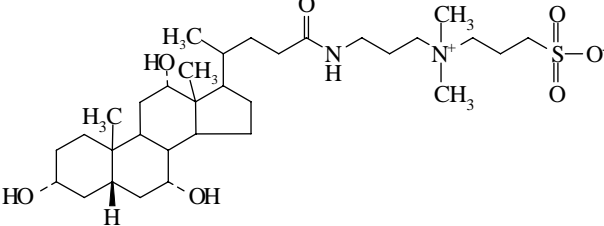
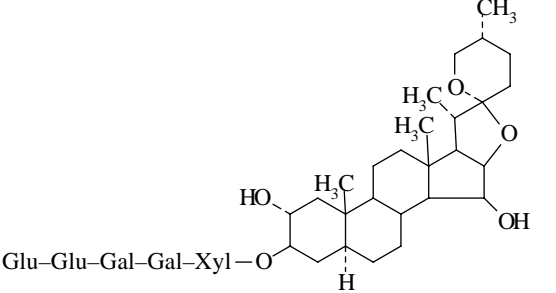
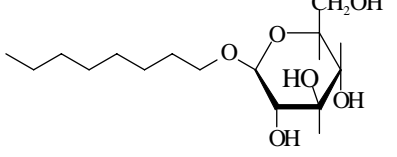
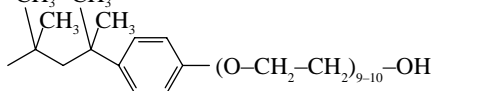
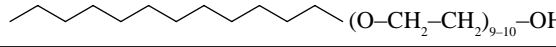
имеющие положительный заряд, анионные, обладающие отрицательным зарядом, и цвиттер-ионные, у которых имеется как положительный, так и отрицательный заряд, и поэтому в целом молекула является электрически нейтральной.

В качестве параметров, характеризующих способность детергентов к мицеллообразованию, обычно используют критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) и число агрегации. ККМ — это та концентрация, при которой детергент начинает обра-

зовывать мицеллы. До этого он находится в воде в мономерной форме в состоянии истинного раствора. Число агрегации показывает, сколько молекул детергента приходится на одну мицеллу.

В мембранных исследованиях используют довольно ограниченный круг детергентов. В табл. 1 представлены те из них, которые чаще всего применяются для солюбилизации и реконструкции мембран. Для этих детергентов характерны довольно высокие значения ККМ ( $10^{-4}$ – $10^{-2}$  М) и то, что они относятся к разряду

**Таблица 1.** Детергенты, наиболее часто используемые для солюбилизации и реконструкции мембран (из [3])

Структурная формула	Название
	Холат натрия (3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -тригидрокси-5 $\beta$ -холанат натрия)
	ЧАПС (3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-пропансульфонат)
	Дигитонин
	Октилглюкозид (октил- $\beta$ -D-глюкопиранозид)
	Тритон X-100 <i>n</i> -( <i>трет</i> -октил)-фениловый эфир полиэтиленгликоля
	Луброл РХ (додecilовый эфир полиэтиленгликоля)

так называемых мягких детергентов, то есть таких, которые не нарушают активности мембранных белков и не вызывают их денатурации или делают это в минимальной степени.

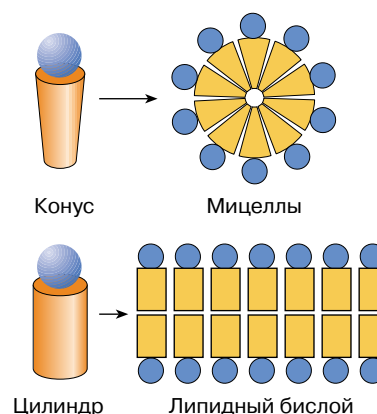
Вообще говоря, выбор детергента для реконструкции мембраны, как правило, представляет сложную задачу, поскольку заранее трудно предсказать, насколько удачным окажется данный детергент для данной конкретной мембраны и для данного конкретного белка. Кроме того, нередко требования к детергенту, используемому для солюбилизации мембраны, отличаются от требований, предъявляемых к детергенту при реконструкции. Поэтому иногда приходится в ходе эксперимента заменять один детергент на другой или использовать смеси разных детергентов.

## ПОЧЕМУ И КАК ДЕТЕРГЕНТЫ РАЗРУШАЮТ МЕМБРАНУ

Большая часть тех веществ, из которых построены биологические мембраны, а это главным образом белки и липиды, практически нерастворимы в воде. Это связано не с тем, что эти вещества являются абсолютно гидрофобными. Напротив, и мембранные липиды, и мембранные белки содержат в составе своих молекул довольно обширные области, образованные гидрофильными группировками, а потому, как и детергенты, являются амфифильными. Весь секрет заключается в балансе гидрофильных и гидрофобных остатков в молекулах этих соединений. А он таков, что величины ККМ для этих веществ очень малы ( $10^{-10}$ – $10^{-9}$  М), и в воде их молекулы проявляют мощную тенденцию к агрегации. Однако в силу особенностей своего строения (см. ниже) они образуют в воде не маленькие мицеллы, а протяженные мембранные агрегаты. В этих структурах неполярные участки молекул формируют гидрофобную область мембраны, которая изолирована от воды гидрофильными группами, расположенными на противоположащих друг другу поверхностях мембранного бислоя.

Почему же детергенты разрушают мембрану? Да потому, что молекулы, образующие мицеллы, и молекулы, склонные к формированию мембран, предъявляют разные требования к геометрии образуемых ими ассоциатов (рис. 2).

Молекулы детергентов, обладающие довольно объемной гидрофильной областью и относительно небольшим гидрофобным участком, в целом имеют форму конуса и поэтому легко упаковываются в структуры с высокой кривизной поверхности типа сферических или цилиндрических мицелл. В свою очередь, в липидных молекулах, образующих мембраны, различия в размерах гидрофильной и гидрофобной области не

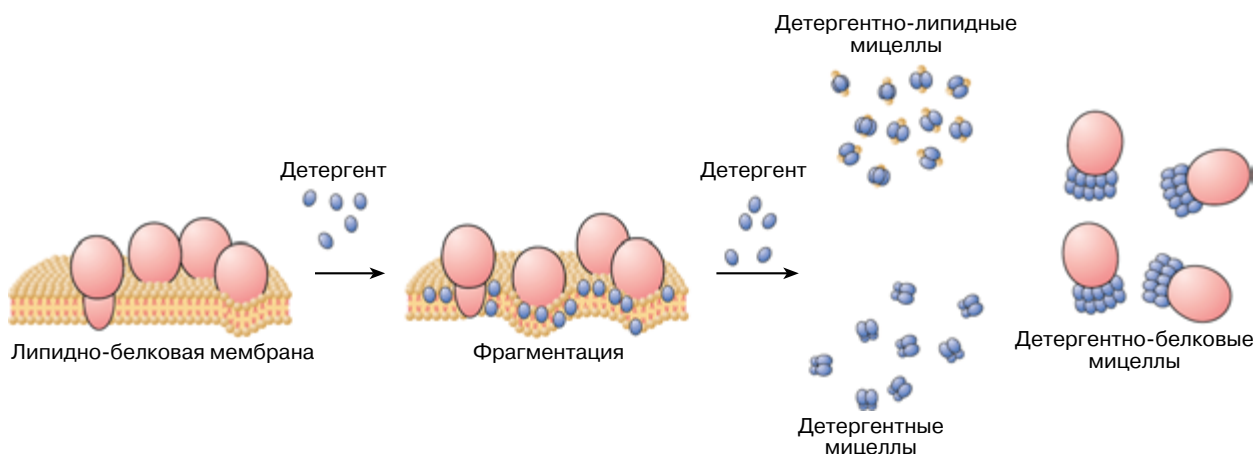


**Рис. 2.** Схематичное изображение формы амфифильных молекул, наиболее склонных к образованию сферических и цилиндрических мицелл или плоского бимолекулярного слоя. На рисунке показано поперечное сечение мицелл и липидного бислоя (модифицированный рисунок из [3])

столь велики. В силу этого они имеют форму цилиндра (или бруска) и лучше всего упаковываются в протяженные липидные бислои минимальной кривизны. Поэтому при одновременном присутствии детергента и липида в составе одного агрегата возникает конфликт между стремлением детергента принять мицеллярную конфигурацию и тенденцией липида сохранить бислойную упаковку молекул в мембране.

Пока детергента в мембране мало, его присутствие проявляется лишь в возникновении дефектов упаковки молекул в липидном бислое с образованием пор, проницаемых для водорастворимых соединений. Но по мере роста содержания детергента изменения упаковки становятся все более значительными и в конечном счете вызывают нарушения целостности мембраны, что приводит к ее разрывам и даже к фрагментации на отдельные частицы. Однако эти частицы все еще сохраняют мембранную организацию, и вся система в целом по-прежнему может рассматриваться как раствор детергента в мембране.

Когда же концентрация детергента в мембране достигает некоторой критической величины и дальнейшее сохранение бислойной организации молекул становится энергетически невыгодным, мембрана начинает разрушаться с образованием смешанных липид-детергентных и белок-детергентных мицелл, которые фактически представляют собой раствор компонентов мембраны в избытке детергента (рис. 3). Это и есть момент солюбилизации, которая приводит к резкому уменьшению размера частиц и как следствие этого — к снижению мутности мембранной суспензии и уменьшению



**Рис. 3.** Солюбилизация мембран с помощью детергентов. Добавление детергента приводит к разрушению мембраны с образованием смешанных детергентно-липидных и детергентно-белковых мицелл (модифицированный рисунок из [3])

количества материала, осаждаемого при центрифугировании.

Для солюбилизации лучше использовать детергенты с низкой ККМ, так как такие детергенты легче встраиваются в мембрану и быстрее вызывают ее распад до смешанных мицелл. В этом качестве наиболее эффективны ионные детергенты, но их недостатком является то, что нередко они вызывают денатурацию белков. Особенно часто это происходит в случае катионных детергентов. Иногда денатурацию можно предотвратить добавив липид в белковый солюбилизиат. Неионные детергенты менее эффективны в качестве солюбилизирующих агентов и иногда не полностью отделяют липиды от белков. Но, возможно, именно поэтому в присутствии неионных детергентов белки лучше сохраняют свою активность.

В солюбилизованном состоянии мембранные белки можно легко отделить от основной массы липидов и подвергнуть дальнейшему фракционированию с целью выделения индивидуального белка или группы белков с интересующим исследователя типом активности. Методы такого фракционирования в настоящее время хорошо отработаны и включают специальные приемы разделения белков с помощью гель-фильтрации, хроматографии и электрофореза в водном буфере, содержащем детергент в концентрации, равной или превышающей его ККМ. В некоторых случаях солюбилизованные препараты выделенных мембранных белков можно использовать для проведения структурно-функциональных исследований, но чаще всего для этого необходимы реконструированные препараты, так как многие мембранные белки могут проявить свою функциональную активность только тогда, когда они находятся в полноценном мембранном окружении.

## ПОЧЕМУ И КАК МЕМБРАНА СОБИРАЕТСЯ

Собственно говоря, сборка мембран происходит в соответствии с теми же принципами, что и их разборка. Если содержание детергента в смешанных мицеллах уменьшать, то стремление солюбилизованных в них молекул к мембранному типу упаковки заставит мицеллы сливаться друг с другом и в какой-то момент, когда оставшегося детергента станет уже недостаточно для сохранения высокой кривизны поверхности в укрупнившихся мицеллярных агрегатах, они превращаются в мембранные структуры.

Таким образом, процессы солюбилизации и реконструкции мембраны зеркально симметричны в смысле обратимости превращений, происходящих при изменении содержания детергента в смеси. Более того, они протекают самопроизвольно, если концентрация детергента становится выше или ниже определенного предела. Единственное, что требуется, чтобы запустить процесс реконструкции, — это знать, каким образом можно удалить детергент из имеющегося солюбилизиата.

В принципе с этим тоже нет больших проблем, поскольку сейчас имеется широкий набор различных способов удаления детергентов. Выбор подходящего способа определяется задачами реконструкции, а также типом детергента, который необходимо удалить. Чаще всего используются четыре основных способа удаления детергента: диализ, гель-фильтрация, сильное разбавление солюбилизиата и адсорбция детергента на гидрофобных полимерах.

Самый простой способ — это удаление детергента с помощью диализа через полупроницаемую целлофановую мембрану. Поскольку молекулы детергента достаточно малы, чтобы пройти через поры диализной

мембраны, а концентрация его мономеров в воде, зависящая от ККМ, сравнительно высока, то детергент постепенно переходит из солюбилизата в диализующий раствор. При этом его содержание в смешанных мицеллах уменьшается и, когда оно становится достаточно низким, мицеллы трансформируются в мембранные структуры. Этот способ хорош для детергентов с высокой ККМ, таких, например, как октилглюкозид или холат натрия. Но неионные детергенты с низкой ККМ типа тритона X-100 при диализе удаляются не полностью. Другой недостаток этого метода состоит в его длительности, так как даже в лучшем случае удаление детергента может занять несколько суток.

Более быстрый способ основан на удалении детергента с помощью гель-фильтрации, когда солюбилизат пропускают через инертный гель, размер пор которого достаточно велик, чтобы удержать молекулы детергента, но мал по сравнению с образующимися мембранными частицами, которые свободно проходят между гранулами геля. Несмотря на быстроту, этот метод не всегда удобен в работе, особенно когда требуется провести реконструкцию большого количества образцов.

Еще быстрее, а фактически почти мгновенно реконструкцию можно осуществить методом быстрого разбавления. Для этого солюбилизат разводят большим объемом не содержащей детергента среды, в результате чего содержание детергента в мицеллах резко падает ниже предельного уровня, которым определяется момент начала формирования мембраны. Этот метод универсален и годится для удаления практически любого детергента. Проблема лишь в том, что сам образец при этом сильно разбавляется, да и детергент удаляется из мембраны далеко не полностью, что может отрицательно сказаться на качестве реконструированного мембранного препарата.

С максимальной полнотой детергент может быть удален из мембраны путем его адсорбции на гидрофобных полимерах. Этот способ особенно хорош для удаления остаточных количеств детергента из уже сформированных мембранных частиц. Однако для удаления детергента из исходного солюбилизата он малоприменим, так как на начальных стадиях реконструкции удаление детергента может сопровождаться адсорбцией значительных количеств белка и липида на полимере. Поэтому обычно этот метод используют в комбинации с другими способами на конечной стадии удаления детергента.

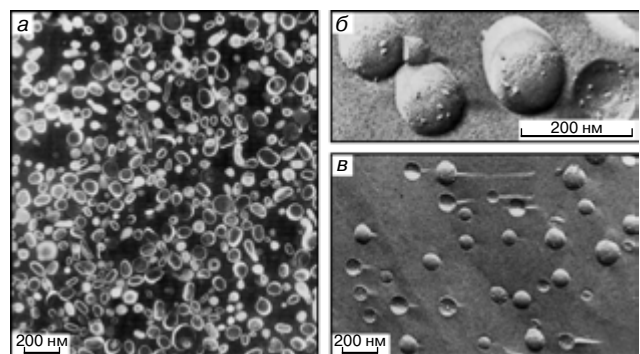
## ЧТО МОЖНО СЧИТАТЬ ХОРОШЕЙ СБОРКОЙ

Что же представляют собой реконструированные мембраны? На рис. 4 приведены электронные микрофотографии реконструированных мембран, содержа-

щих белок полосы 3, который отвечает за транспорт анионов в мембране эритроцитов. Хорошо видно, что полученные препараты содержат частицы овальной формы размером около 100 нм, ограниченные одной мембраной. На фотографиях, полученных методом замораживания-скалывания при большом увеличении, можно видеть, что в мембрану вкраплены еще более мелкие частички, которые принимают за белки, внедренные в липидный бислой. Как правило, реконструированные белоксодержащие мембраны представляют собой замкнутые пузырьки (или везикулы), которые получили название протеолипосомы (более подробно о липосомах и везикулах см: Барсуков Л.И. // СОЖ. 1998. № 10. С. 2–9).

Конечно, весьма желательно, чтобы реконструированные мембраны по своей морфологии, структурной организации, физико-химическим характеристикам и функциональной активности были бы максимально близки к своим природным прототипам. Следует, однако, сказать, что приведенные на рис. 4 микрофотографии являются на редкость удачными, и пришлось немало потрудиться, чтобы найти их в громадном ворохе публикаций, посвященных реконструкции мембран. Чаще всего результаты реконструкции бывают не столь хороши, потому что до сих пор реконструкция является скорее искусством, чем наукой. Дело в том, что нет ни универсального метода реконструкции, ни универсального детергента, которые были бы пригодны на все случаи жизни. Поэтому исследователю, сталкивающемуся с необходимостью получить реконструированные мембраны, зачастую приходится полагаться на собственную интуицию и опыт предшественников, следуя некоему набору эмпирических правил.

С учетом сказанного выше не стоит удивляться тому, что, как правило, намного легче сформулировать



**Рис. 4.** Морфология реконструированных мембранных везикул, содержащих белок полосы 3, по данным электронной микроскопии: *а* – негативное контрастирование, *б* и *в* – замораживание-скалывание (из: Scheuring et al. // J. Membrane Biol. 1986. Vol. 90. P. 123–136)

критерии идеальной реконструкции, чем успешно ее осуществить. Очевидно, что такая реконструкция должна приводить к гомогенной популяции моноламеллярных (то есть однослойных) протеолипосом одного размера с одинаковым соотношением липид–белок. Желательно, чтобы реконструированная мембрана имела такую же проницаемость, как и нативная, и чтобы протеолипосомы имели достаточный внутренний водный объем, позволяющий измерить содержание транспортируемых в него веществ. Мембрана протеолипосом не должна содержать остаточного детергента, а ее липидный состав должен быть оптимальным для проявления функциональной активности данного белка. Этот перечень можно было бы продолжить и дальше, если бы не еще одна принципиально важная проблема, которой мы пока не касались в нашей статье.

Речь идет о топологической асимметрии мембран. Дело в том, что все нативные мембраны асимметричны в том смысле, что их компоненты (как белки, так и липиды) неодинаковым образом распределены между наружной и внутренней сторонами мембраны. В идеале реконструированные мембранные белки должны иметь строго определенную ориентацию в мембране, соответствующую их ориентации в нативной мембране или отвечающую задачам поставленного эксперимента. В случае липидов также желательно иметь возможность задавать им нужное трансмембранное распределение. Однако на практике эти требования осуществить весьма сложно, так как топологическая ориентация мембранных компонентов зависит (иногда непредсказуемым образом) от многих параметров, а также от методов, используемых для солюбилизации и реконструкции.

Все это показывает, что проблема состоит не в том, чтобы провести реконструкцию вообще (как мы с вами теперь знаем, она происходит самопроизвольно), а в том, чтобы сделать это правильно или, говоря другими словами, сделать реконструкцию направленной на получение мембран с заданной структурой и функциональными свойствами. Пока эта задача окончательно еще не решена, но уже имеются методические подходы, позволяющие изменять в нужном направлении свойства реконструированных мембран.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время многие проблемы, связанные с реконструкцией мембран, уже решены, свидетельством чему является колоссальное количество статей, опубликованных на эту тему с начала 60-х годов XX в. Не будет преувеличением сказать, что впечатляющие успехи, достигнутые сегодня в изучении мембранных белков, напрямую связаны с применением методов солюбилизации и реконструкции. С помощью этих методов многие белки были выделены в индивидуальном

состоянии, что позволило установить их химическое строение и выяснить молекулярные механизмы функционирования.

Реконструированные системы дают прекрасную возможность изучать принципы, лежащие в основе структурной организации биологических мембран, и выяснять тонкие детали межмолекулярных взаимодействий в мембранах с помощью различных физико-химических методов.

Методами реконструкции удастся воспроизводить сложнейшие системы, ответственные за такие жизненно важные функции, как, например, энергетическое обеспечение клетки, транспорт метаболитов, рецепция и передача информации, а также регуляция внутриклеточных процессов.

И наконец, знание принципов самосборки молекул в мембранные структуры дает нам, с одной стороны, возможность понять, как формируются мембраны внутри клетки, а с другой — позволяет применить эти принципы для построения искусственных систем, перспективных с точки зрения возможностей их практического применения. Именно в этом направлении идет сегодня дальнейшее развитие исследований в области реконструкции мембран.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Геннис Р.* Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. М.: Мир, 1997.
2. Биологические мембраны: Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж.Б. Финдлея, У.Г. Эванза. М.: Мир, 1990. С. 196–250.
3. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. С. 513–636.
4. *Кагава Я.* Биомембраны: Пер. с яп. М.: Высш. шк., 1985.
5. *Рэкер Э.* Биоэнергетические механизмы: Новые взгляды: Пер. с англ. М.: Мир, 1979.
6. *Rigaud J.-L., Pitard B., Levy D.* Reconstitution of membrane proteins into liposomes: Application to energy-transducing membrane proteins // *Biochim. et biophys. acta.* 1995. Vol. 1231. P. 223–246.
7. *Lasic D.D.* Liposomes: From Physics to Applications. Amsterdam: Elsevier, 1993. P. 243–251.

Рецензент статьи Ю.А. Чизмаджев

\* \* \*

Леонид Иванович Барсуков, кандидат химических наук, доцент кафедры физико-химической биологии и биотехнологии Московского физико-технического института, ведущий научный сотрудник Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Область научных интересов – биологические и искусственные мембраны. Автор более 100 научных работ.