

А. ПАСЫНСКИЙ и В. ПЛАСКЕЕВ

ДИФфуЗИЯ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС ЛИЗОЦИМА

(Представлено академиком А. Н. Бахом 8 XII 1944)

Лизоцим, как известно, является естественным бактерицидным веществом, широко распространенным в природе; так, например, лизоцим был обнаружен в курином белке, в слезах, слизи носа, слюне, кровяной сыворотке, в экстрактах различных органов (сердце, печень, костный мозг, почки и др.), в молоке, репе, капусте, хрене. Яичный лизоцим, благодаря сравнительно высокой концентрации лизоцима в белке и удобству его получения, является основным видом препарата этого продукта.

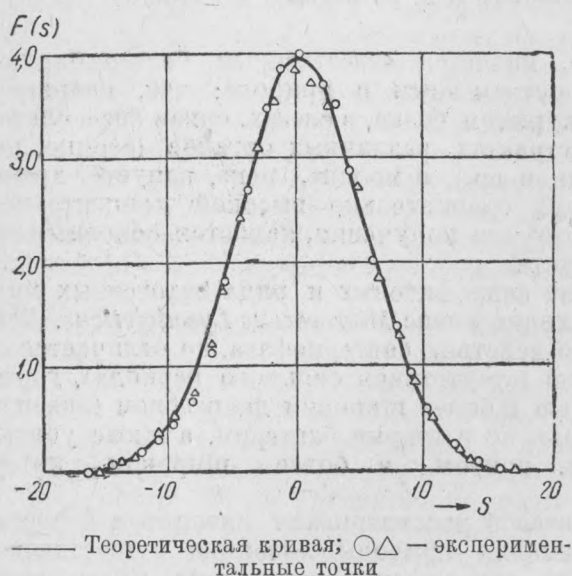
Лизоцим вызывает лизис сапрофитовых и ряда патогенных микробов, особенно легко проходит лизис *Micrococcus Lysodeicticus*. Действие лизоцима аналогично действию бактериофага, но отличается от последнего своей быстротой (отсутствием скрытого периода), гораздо меньшей специфичностью и более широким диапазоном (лизоцим лизирует не только молодые, но и старые бактерии, а также убитые бактериальные клетки и, притом, в более широком интервале температур).

Большинство исследователей рассматривают лизоцим в качестве полипептида⁽¹⁾. Для понимания природы лизоцима существенное значение имеет определение его молекулярного веса. Способность лизоцима к диффузии через агар и целлофановую мембрану указывает на небольшие размеры частиц лизоцима. Однако прямое определение было произведено по просьбе Абрагама и Робинсона⁽²⁾ лишь Фильпотом, который при помощи ультрацентрифуги установил, что лизоцим имеет молекулярный вес порядка 18 000; как указывают сами авторы⁽²⁾, это определение имело совершенно предварительный характер. В настоящей работе мы произвели определение молекулярного веса лизоцима путем измерения диффузии лизоцима по способу Ламма — Польсона⁽³⁻⁴⁾, соответствие результатов которого данным, полученным при помощи ультрацентрифуги, было для белковых веществ специально проверено Польсоном⁽⁴⁾.

Методически способ Ламма сводится к фотографированию точной микрометрической шкалы через столб жидкости, в котором происходит процесс диффузии. Благодаря наличию вертикального градиента концентрации положение делений шкалы на снимке изменяется по сравнению с контрольным снимком шкалы, снятым через чистый растворитель. Различие в положении делений на обоих снимках измеряется при помощи компаратора (с точностью до 2—3 μ) и является мерой градиента концентрации диффундирующего вещества в растворе, что, в свою очередь, позволяет определить коэффициент диффузии вещества. Сопоставление нормализованной экспериментальной кривой и теоретической кривой Гаусса позволяет одновременно ха-

рактизовать, при отсутствии посторонних аномалий, молекулярную однородность вещества. Кроме коэффициента диффузии, для расчета молекулярного веса необходимо также знать отношение полуосей частиц b/a ; эта последняя величина определяется из вязкости разбавленных растворов исследуемого вещества. Методика расчетов и установка для измерения диффузии описаны одним из нас в (5). Длиннофокусный объектив, применявшийся в нашей установке, имел $F = 80$ см.

Препарат лизоцима приготовлялся из свежего яичного белка по модифицированному способу Бордэ и очищался переосаждением из 80% спирта по способу Буяновской (1)*. Затем 0,5% раствор очищенного препарата лизоцима тщательно диализовался на леднике через коллоидную мембрану против дистиллированной воды; после этого к раствору добавлялся хлористый натрий (до 1%), и раствор вторично диализовался против 1% NaCl. Внешний раствор 1% NaCl при равновесном диализе применялся



затем в качестве верхней жидкости в опытах по диффузии. Внутренний раствор с концентрацией 0,4% лизоцима + 1% NaCl с $pH = 6,34$ (измеренным со стеклянным электродом) служил в качестве основного раствора в опытах по диффузии и вязкости. Биологическая активность раствора сохранялась нормальной (по данным Буяновской). Все опыты были проведены при $20^\circ C \pm 0,01$. Значения коэффициента диффузии $D \cdot 10^{-7}$, при продолжительности опыта от 7200 до 10800 секунд, составляли: 8,8; 8,4; 8,7; в среднем $D_{20, w} = 8,6 \cdot 10^{-7}$ см²/сек. Хорошее совпадение нормализованных экспериментальных данных с теоретической кривой Гаусса (см. рисунок) указывает на молекулярную однородность препарата и отсутствие аномалий, обусловленных зарядом частиц или концентрацией препарата. Значение коэффициента вязкости разбавленных растворов лизоцима (менее 0,1%) в 1% NaCl

$$K = \frac{\eta_r - 1}{vc} = 15,8,$$

где η_r — относительная вязкость раствора, $v = 0,75$ — удельный парциальный объем и c — концентрация лизоцима в г/см³. По уравнению Польсона (4) $K = 4,0 + 0,098 (b/a)^2$, откуда при $K = 11,8$ $b/a = 11$; этому значению b/a соответствует коэффициент диссимметрии (5) $f/f_0 = 1,58$.

На основании приведенных данных можно вычислить молекулярный вес M по формуле (4, 5)

$$M = \frac{k'}{(f/f_0)^3 D^3 v},$$

где $k_{20, w} = 2,41 \cdot 10^{-14}$.

* Авторы приносят глубокую признательность проф. З. Ермольевой и И. Буяновской за предоставление препарата лизоцима и постоянный интерес к работе.

Подставляя $f/f_0 = 1,58$, $D = 8,6 \cdot 10^{-7}$ и $v = 0,75$, получим $M = 12\ 800$. Таким образом, лизоцим, согласно нашим определениям, имеет округленно молекулярный вес $M = 13\ 000$ и состоит из однородных вытянутых частиц с соотношением полуосей $b/a = 11$.

Интересно заметить, что из определенного Мейером и сотрудниками⁽⁶⁾ элементарного состава лизоцима С—48,65%, Н—6,44%, N—15,33%, Р—0,25%, зола—3,31% и S—0,64% следует, как легко вычислить, эмпирическая формула $C_{500}H_{790}O_{195}N_{135}S_{2,5}P$, соответствующая молекулярному весу 11920; же лая получить целочисленное отношение S:Р, указанные авторы удваивают формулу и получают $M = 24\ 000$, однако точность определения S вряд ли оправдывает подобное изменение; принимая, что S:Р = 2 или 3, мы получим округленно $M = 12\ 000$, что хорошо совпадает с определенным нами значением $M = 13\ 000$.

Обычно в литературе лизоциму приписывают природу фермента муколитического действия. Однако, учитывая низкомолекулярную структуру лизоцима, можно высказать предположение, что его действие на оболочки бактериальных клеток аналогично эффекту растворяющего и пептизирующего действия низкомолекулярных фракций на более высокомолекулярные продукты, известному в коллоидной химии для ряда коллоидов: серумглобулина, желатины, эфиров целлюлозы и других высокомолекулярных веществ. С этим предположением вполне согласуются основные известные факты: сравнительно малая специфичность лизоцима, быстрота его действия, доказанная адсорбируемость лизоцима на чувствительных клетках, набухание стенок бактериальных клеток перед лизисом, пропорциональность литического действия концентрации лизоцима и др. Характерно также, что обработка бактерий спиртом (в течение нескольких часов) и хромовой кислотой (в течение 10 минут), вызывающая, между прочим, за дубливание оболочек бактериальных клеток, делает бактерии устойчивыми к действию лизоцима.

Такие факты, как наличие оптимума рН, изменение электрокинетического потенциала бактерий в присутствии лизоцима, влияние солей на действие лизоцима и т. п., указывают, повидимому, на ту роль, которую играют в адсорбции лизоцима полярные группы. Возможно, таким образом, что литическое действие лизоцима в связи с его низкомолекулярной природой является в своей основе частным случаем известного в коллоидной химии растворяющего действия низкомолекулярных фракций.

Лаборатория коллоидной химии
Всесоюзного института экспериментальной
медицины и
Институт биохимии Академии Наук СССР

Поступило
8 XII 1944

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ З. Ермольева, Усп. соврем. биологии, **9**, 68 (1938). ² E. Abraham and R. Robinson, Nature, **140**, 24 (1937); Biochem. J., **33**, 622 (1939). ³ O. Lamm and A. Polson, Biochem. J., **30**, 538 (1936). ⁴ A. Polson, Koll. Z., **87**, 149 (1939). ⁵ А. Пасынский, Усп. хим., **10**, 526 (1941). ⁶ K. Meyer, J. Palmer, R. Thompson and D. Khorazo, J. Biol. Chem., **113**, 479 (1936).