

Н. Е. ПЛОТНИКОВА

## ВЫДЕЛЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ИЗ КОЖИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ПТИЦ, РЕПТИЛИЙ, АМФИБИЙ И РЫБ

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 8 VI 1947)

Ореховичем и сотрудниками (1-5) было установлено, что в коже животных (крыс) содержится белок, устойчивость которого по отношению к протеиназам значительно изменяется под влиянием ряда факторов.

В результате предпринятых в лаборатории исследований удалось выделить (8) этот белок в кристаллическом виде и затем изучить ряд свойств белка (6-8). Наряду с изучением химической природы и биологического значения этого белка необходимо было выяснить распространение его в природе. С этой целью нами и была предпринята данная работа.

Объектом исследования служила кожа отдельных представителей различных классов позвоночных: млекопитающих (теленка, кошка, собака, кролик), птиц (курица), рептилий (черепаха), амфибий (лягушка) и рыб (судак).

Кожу брали немедленно после забоя и обескровливания животных\*. Внешние покровы (чешую, перья, шерсть, роговые пластинки) подкожную клетчатку, жир и т. п. тщательно удаляли и остальной материал размельчали. К навескам кожной кашицы добавляли цитратный буфер (рН буфера различных порций колебался от 1,5 до 6) и смесь ставили в рефрижератор. Экстракт, содержащий искомый белок, ставился на диализ против водопроводной воды или против сантимолярного раствора двузамещенного фосфата Na. Через сутки, как правило, выпадали кристаллы белка. Детали метода описаны Тустановским (8).

### Результаты исследований

1. Кролик. Наиболее благоприятные условия для кристаллизации белка имеют место в экстрактах буфером рН=3,8. При экстрагировании более кислым буфером кожа сильно набухает и белок плохо переходит в раствор. При экстрагировании буфером, рН которого выше 4,5, набухания кожи не наблюдается; белок хорошо переходит в раствор, но кристаллизуется плохо и форма кристаллов изменяется. При наиболее благоприятных условиях экстракции белок переходит в раствор постепенно. Мы экстрагировали одну и ту же порцию кожи девять раз (в течение 26 дней), и во всех экстрактах содержался белок (галертная проба Тустановского), хотя наибольшее количество белка содержалось в первых двух экстрактах.

\* Кожу рыб брали от свежемороженых судаков.

Общий выход белка до 3,4% (сухой вес к сухому весу кожи). Кристаллы белка из кожи кролика (рис. 1) идентичны по форме кристаллам белка из кожи крыс. Максимальная величина кристаллов 260  $\mu$ .

2. Собака. Из кожи собаки также удалось выделить кристаллический белок. Выход белка 0,6% к сухому весу кожи. Оптимальные условия для кристаллизации белка — экстракция буферными растворами с  $pH=3-4$ . Белок можно экстрагировать или более кислыми или более щелочными буферными растворами, но кристаллизовать его при этих условиях не удается. Максимальная длина белковых кристаллов — 130  $\mu$ .

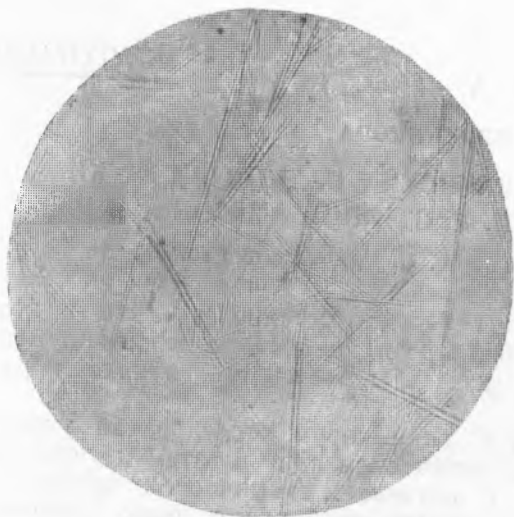


Рис. 1. Кристаллический белок из кожи кролика

3. Кошка. К измельченной коже кошки добавлялся цитратный буферный раствор  $pH=3,08; 3,52; 3,96$  и  $4,47$ . Экстракты ставились на диализ против 0,01M двузамещенного фосфата натрия и против водопроводной воды. При диализе против сантиметомлярного двузамещенного фосфата натрия кристаллизация шла лучше. Во всех пробах были получены кристаллы белков в виде длинных игл, величина которых колебалась от 52 до 130  $\mu$ .

4. Теленок. Из кожи теленка кристаллы белка выделяются легко. Зона  $pH$  буферных растворов, которыми можно экстрагировать белок с последующей кристаллизацией его, довольно велика и колеблется от 2 до 5 (в отличие от того, что мы наблюдали для собаки, где эта зона очень ограничена). Условия кристаллизации и размеры кристаллов см. в табл. 1.

Таблица 1

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$pH$ исходного буфера	2,13	2,77	2,91	3,45	3,80	4,43	5,01	5,37	6,07	6,42	6,80
$pH$ экстракта . . . . .	4,43	4,20	4,22	4,45	4,64	4,84	5,40	5,02	6,16	6,60	6,86
Размеры кристаллов в $\mu$	65	130—156	156—195	156—195	130—195	130—104	нити и колоски	колоски	—	—	—

В случае экстрагирования белка буферным раствором  $pH=5$  или 5,37 образуются не отдельные игольчатые кристаллы (рис. 2, а), а пучки их, часто напоминающие колоски (рис. 2, б). Выход кристаллического белка 0,86% (к сухому весу кожи).

5. Куры. В качестве объекта для исследования была взята кожа цыплят в возрасте около 1,5 месяца. Белковые кристаллы получались в экстрактах буферными растворами  $pH=2,69$  до 5,46, но форма кристаллов была различна, в зависимости от  $pH$  этих растворов (см. табл. 2).

При диализе экстрактов против сантиметомлярного раствора двузамещенного фосфата Na кристаллы белка выпадают из более кислых экстрактов, чем при диализе против водопроводной воды.

Таблица 2

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH исходн. буфера	1,57	2,20	2,69	3,07	3,51	3,98	4,53	5,07	5,46	6,12
pH экстракта . . .	набухание		—	4,36	4,55	4,69	4,94	5,48	5,75	6,28
Размеры кристаллов, получен. при диализе против фосфата Na, $\mu$ . . .			13—19	26—39	52—91	91—130	до 260	колоски	мелк. колоски	—
Размеры кристаллов, получ. диализом против воды, $\mu$ . . . . .	—	—	—	—	13—26	65—78	260—320	колоски	колоски	—

Таблица 3

№ пробы	1	2	3	4	5
pH исходного буфера . . . . .	1,96	2,97	3,89	4,94	6,24
pH экстракта . . . . .	4,38	4,43	4,71	4,83	4,86
Размеры кристаллов при диализе против воды, $\mu$ . . . . .	39—65	39—52	—	—	—
Форма кристаллов при диализе против фосфата Na, $\mu$ . . . . .	нити	нити	—	—	—

Таблица 4

№ пробы	1	2	3	4	5
pH исходного буфера . . . . .	2,11	3,09	3,46	4,00	5,04
pH экстракта . . . . .	3,68	4,10	4,27	4,54	5,25
Размеры кристаллов при диализе против воды, $\mu$ . . . . .	—	13	13—26	—	13—20
Размеры кристаллов при диализе против фосфата Na, $\mu$ . . . . .	нити 26—65	26—65	13—26	13—26	13—26

Таблица 5

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH исходн. буфера	1,58	2,14	2,57	3,11	3,47	4,01	4,55	5,04	5,42	6,13
pH экстракта . . .	набухание				5,40	5,01	5,23	5,56	5,85	6,24
Размеры кристаллов при диализе против воды, $\mu$ . . . . .					26—39	65—91	39—52	26—39	26—39	—
Размеры кристаллов при диализе против фосфата Na, $\mu$ . . . . .					26—39	39—52	26—39	39—65	26—39	—

6. Черепаха. Для получения кристаллического белка из кожи среднеазиатской степной черепахи необходимо экстрагировать этот белок более кислыми буферными растворами, чем это отмечалось нами для других видов животных. Условия кристаллизации и размеры кристаллов см. в табл. 3.

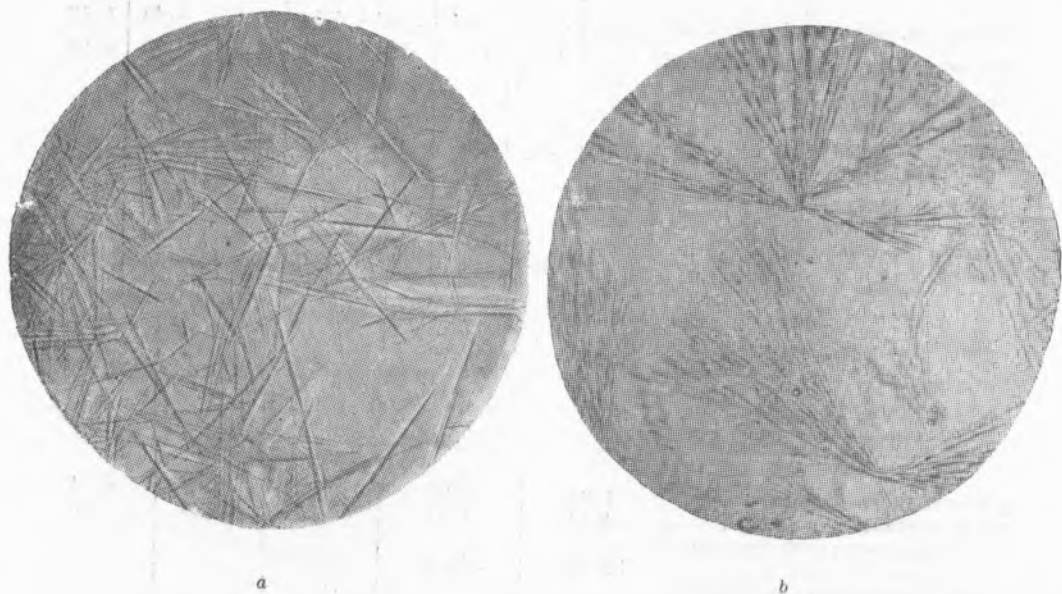


Рис. 2. Кристаллический белок из кожи телянка

Получить игольчатые кристаллы можно только при диализе экстракта против водопроводной воды. При диализе против раствора сантимольярного раствора двузамещенного фосфата натрия обнаруживаются длинные нити.

7. Лягушка. Были получены белковые кристаллы и из кожи лягушки (*Rana temporaria*). Выход кристаллов очень небольшой. Кристаллизация протекает лучше при диализе против сантимольярного раствора двузамещенного фосфата Na и значительно хуже при диализе против водопроводной воды. Условия кристаллизации и размеры кристаллов приводятся в табл. 4.

8. Рыбы. В качестве объекта для исследования белка взята кожа судака (вес рыбы от 2100 до 2300 г). После удаления чешуи кожа измельчалась и белок экстрагировался растворами цитратного буфера, рН которого изменялся от 1,58 до 6,13. Экстрагировать белок удавалось буферными растворами рН=3,47—4,42. Во всех этих случаях после диализа против водопроводной воды или 0,01M раствора двузамещенного фосфата натрия выпадали игольчатые белковые кристаллы. Данные об условиях кристаллизации см. в табл. 5.

Выход кристаллического белка большой: 2,5% (к сырому весу кожи).

Лаборатория химии белков  
Института биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
8 VI 1947

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Н. Орехович, Биохимия, 3, 456, 616 (1938). <sup>2</sup> В. Н. Орехович, Биохимия, 5, 33 (1944). <sup>3</sup> V. N. Orekhovich, Am. Rev. Sov. Med., 6, 517 (1944). <sup>4</sup> В. Н. Орехович, Бюлл. эксп. биол. и мед., 22, 57 (1946). <sup>5</sup> В. Н. Орехович, К. И. Страичкий и К. Д. Орехович, Бюлл. эксп. биол. и мед., 22, 60 (1946). <sup>6</sup> В. Н. Орехович и А. А. Тустановский, Бюлл. эксп. биол. и мед., 23, 197 (1947). <sup>7</sup> В. Н. Орехович, А. А. Тустановский и К. Д. Орехович, ДАН, 57, № 5 (1947). <sup>8</sup> А. А. Тустановский, Биохимия, 12, № 4 (1947).