

К. И. СТРАЧИЦКИЙ

**ИЗМЕНЕНИЕ РЕАКТИВНОСТИ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП
И ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ЯИЧНОМ
АЛЬБУМИНЕ ПРИ ДЕНАТУРАЦИИ**

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

Известно, что нативный яичный альбумин не дает реакции с нитропруссидом натрия, порфириндином и феррицианидом на присутствие сульфгидрильных групп, которые легко обнаруживаются с помощью тех же реагентов при денатурации этого белка.

Вызываемое денатурацией изменение находится, повидимому, в непосредственной связи с нарушениями в структуре молекул белка.

Согласно представлениям Мирского и Паулинга (¹), SH-группы не могут быть химически определены в нативном яичном альбумине потому, что, будучи сосредоточены внутри молекул, они защищены там от воздействия специфических для них реагентов. В результате денатурации конфигурация молекул изменяется. Молекулы вытягиваются, SH-группы вследствие этого раскрываются и становятся доступными для реагентов, а следовательно, и для количественного определения.

В случае правильности высказанного взгляда, естественно предположить, что денатурация вызовет повышение реактивности не только сульфгидрильных, но и других белковых групп, частично или полностью расположенных внутри компактных глобулярных молекул.

Подобные высказывания делались уже неоднократно (¹⁻³), однако, до сих пор никем еще не были получены убедительные экспериментальные доказательства этого положения.

Излагаемые в настоящем сообщении исследования посвящены изучению реактивности пептидных связей в яичном альбумине при постепенной его денатурации. В частности, было проведено сопоставление интенсивности энзиматической гидролиземости этих связей с возникновением определяемых в нейтральных условиях SH-групп.

Кристаллический альбумин для опытов готовился из свежих куриных яиц по методу Барановского (⁴). В качестве денатурирующего фактора применялась мочеви́на (препарат фирмы Кальбаум — Шеринг). Степень денатурации белка контролировалась по оптической активности и вязкости его растворов.

Мерой реактивности пептидных связей в белке служил показатель их гидролиземости папаином (препарат фирмы Нема Оуг С⁰, США). Этот фермент выбран потому, что по данным Лайнуивера и Гувера (²), подтверждаемым личными наблюдениями автора, он не денатурируется высокими концентрациями мочевины.

Исходный раствор белка не содержал в отношении папаина антиэнзимного фактора. От прибавления его к денатурированной темпера-

турой и потому легко расщепляемой пробе альбумина скорость гидролиза последнего папаином не нарушалась. Для большей убедительности интенсивность гидролиза белка учитывалась различными способами:

а) по нарастающей карбоксильных групп (титрованием реакционной смеси NaOH в спиртовом растворе по Вильштэттеру и Вальдшмиту — Лейтцу; б) тирозиновым методом по Ансону (5) и в) по оптической активности перешедших в раствор, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктов распада белка (по Виннику и Гринбергу (6)).

Реактивность сульфгидрильных групп определялась при pH=6,8 при помощи феррицианида, по Мирскому (7).

Результаты исследований частично представлены в табл. 1, 2.

Таблица 1

Гидролизуемость белка папаином

Условия опыта: конц. белка — 1,59%; pH = 7 (фосф. буфер); на 26 мл смеси добавлялось 30 мг папаина и 10 мг цистеина; температура опыта 35° С

	Г и д р о л и з							В показании оптической активности.
	в мл 0,05 N NaOH				в мг тирозина			
	на 2 мл реакц. смеси при экспоз. в минутах							
	15	30	60	120	15	60	120	
Нативный белок	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	-0,10
+ мочеви́на (0,25 г на мл)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	-0,09
+ мочеви́на (0,5 г на мл)	0,10	0,10	0,10	0,13	0,05	0,05	0,05	-0,39
+ мочеви́на (0,75 г на мл)	0,11	0,14	0,24	0,30	0,12	0,17	0,17	-0,60
+ мочеви́на (1 г на мл)	0,12	0,28	0,37	0,41	0,14	0,22	0,29	-1,00

Примечание: При учете гидролиза по оптической активности образующихся небелковых продуктов бралось 12 мл реакц. смеси, которые осаждались равным объемом 10% трихлоруксусной кислотой и фильтровались; фильтратом заполнялись двухдигитровые трубки, в которых и производилось определение угла вращения поляриметром при D-натриевой линии.

Таблица 2

Изменение оптической активности, вязкости и содержания SH-групп в яичном альбумине при денатурации

	$[\alpha]_D$	Относит. вязкость	SH-группа в % цистеина
Нативный белок	-35°	1,066	0,04
+ мочеви́на (0,25 г на мл)	-35°	1,078	0,07
+ мочеви́на (0,5 г на мл)	-48°	1,148	0,34
+ мочеви́на (0,75 г на мл)	-71,4°	1,495	0,69
+ мочеви́на (1 г на мл)	-88,9°	1,690	0,93

Примечание: Оптическая активность определялась поляриметром фирмы Адам-Хильгера при D-натриевой линии при комнатной температуре в присутствии фосф. буфера pH = 7. Вязкость определялась вискозиметром Оствальда в присутствии фосф. буфера pH = 7 при 20±0,2° С; конц. белка 1,54%.

При рассмотрении таблиц прежде всего следует отметить, что все применявшиеся для учета гидролиза белка методы дали в общем однозначные показания. В пробах нативного белка в течение 60 минут гидролиз полностью или почти полностью отсутствует. Некоторая, весьма незначительная расщепляемость их, отмеченная по истечении 15 минут, несомненно объясняется их загрязнением примесью денатурированного белка. SH-группы в соответствующей пробе альбумина обнаружены в ничтожно малом количестве.

Почти не было гидролиза и в пробах белка, обрабатывавшихся самой низкой дозировкой мочевины (0,25 г на мл). При этой дозировке мочевина не оказывала существенного влияния (оптическая активность, вязкость и содержание SH-групп в белке заметно не изменялись).

При последующей, более высокой концентрации мочевины вызывала уже значительное денатурирующее действие, на что указывает повышение оптической активности и вязкости соответствующих белковых растворов (табл. 2). Характерно, что при воздействии на белок этой концентрацией мочевины наблюдалось также существенное повышение степени энзиматического гидролиза белка, а также и содержания в нем SH-групп. При дальнейшем увеличении концентрации мочевины расщепляемость белка, а также и содержание в нем SH-групп постепенно возрастает, что в полной мере согласуется с изменением в соответствующих пробах показателей оптической активности и вязкости растворов белка.

Из сопоставления показателей оптической активности, вязкости, энзиматического гидролиза и содержания SH-групп (табл. 1 и 2) между собой видно, что все они закономерно изменяются в процессе постепенной денатурации яичного альбумина. Эти показатели согласованно характеризуют различные стороны одного и того же процесса изменения белка, а именно: повышение вязкости указывает на увеличение асимметрии белковых молекул; резкое увеличение оптической активности свидетельствует о наличии весьма существенных структурно-химических изменений в белковых молекулах, а возникновение определяемых в нейтральной среде SH-групп в белке и изменение (понижение) энзиматической устойчивости говорят о повышении доступности различных участков белковой молекулы по отношению к специфическим.

Таким образом, в результате проведенной работы, получены новые данные, характеризующие обусловленные денатурацией изменения в реактивности белковых групп. В частности, показано что постепенному повышению расщепляемости папаином соответствующих пептидных связей в яичном альбумине в процессе его денатурации соответствует нарастание в нем SH-групп.

Пользуюсь случаем выразить благодарность проф. В. Н. Ореховичу за ценные указания и содействие в проведенной работе.

Лаборатория тканевых белков
Института биологической и медицинской химии
Академии Медицинских Наук СССР

Поступило
8 VI 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. E. Mirsky, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 6, 150 (1938); 9, 278 (1941). ² H. Lineweaver and S. Hoover, J. Biol. Chem., 137, 325 (1941). ³ M. L. Anson, Advances in Protein Chemistry, II, 361 (1945). ⁴ Т. Барановский, ДАН, 28, 723 (1940). ⁵ M. L. Anson, Gen. J. Physiol., 22, 79 (1938). ⁶ T. Winick and D. M. Greenberg, J. Biol. Chem., 137, 429 (1941). ⁷ A. E. Mirsky, J. Gen. Physiol., 24, 709 (1941).