

А. Д. БРАУН

СВЯЗЫВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ НАТИВНЫМИ И ДЕНАТУРИРОВАННЫМИ НИТЯМИ МИОЗИНА

(Представлено академиком Л. А. Орбели 17 VII 1948)

В прежних наших опытах соединения миозина с красителями были исследованы в растворах; использовались диффузионный метод, а также спектрофотометрический (по влиянию белка на спектр поглощения красителей в видимой области). Было установлено, что миозин, как и ряд других белков, обладает значительным сродством к многим основным и кислым красителям. Было также найдено, что при денатурации миозина способность его к связыванию красителей увеличивается.

В настоящее время мы располагаем данными по окрашиванию коагулированного миозина и, в частности, миозиновых нитей. Последний объект в некоторых чертах приближается к природному мышечному волокну.

Мы нашли, что нити миозина хорошо воспринимают основные и кислые красители и могут служить демонстративной моделью опытов Д. Н. Насонова, В. Я. Александрова и их сотрудников по окраске мышц.

При возбуждении под влиянием различных повреждающих воздействий и при умирании способность мышц к сорбции красителей увеличивается; явление трактуется как следствие денатурационного изменения мышечных протеинов при указанных состояниях. В опытах с нитями это объяснение получает новое и убедительное подтверждение.

Состояние миозина, а также условия его взаимодействия с красителями в растворе и нитях различны: в растворе мы имели свободное и беспорядочное расположение белковых частиц, в нитях они в известной степени фиксированы и ориентированы; в растворе содержалось сравнительно много солей — окрашивание нитей ведется в присутствии малых концентраций электролитов.

Миозин для нитейготавливался из мышц кролика короткой экстракцией забуференным раствором KCl. Превосходные нити дал также миозин, полученный по Данилевскому экстракцией NH_4Cl .

В опытах с окрашиванием нитей количественного характера важно получать нити равной толщины и длины. Это достигается одним из следующих приемов.

А. Нитиготавливаются в стаканах или кристаллизаторах; в каждый сосуд вдувается по одному и тому же объему раствора миозина под постоянным давлением.

Б. На дно большого кристаллизатора, наполненного водой, укладываются 10—12 предметных стекол длинными сторонами друг к другу. Нити выдуваются так, чтобы они ложились вдоль этой дорожки из стекол параллельными рядами. После этого по границе между стекла-

ми нити рассекаются бритвой, и таким образом на каждом стекле остается равное число (20—25) коротких нитей.

Контрольные опыты с окрашиванием серии нитей, полученных по одному из указанных способов, показали, что колебания в сорбционных свойствах отдельных образцов не превышают 5—8%.

Приготовленные нити промываются водой для удаления солей, после чего погружаются в раствор красителя. Окрашенные нити споласкиваются водой*.

Количество красителя определяется путем экстракции его из нитей подкисленным спиртом в течение 1 суток и фотометрией экстракта.

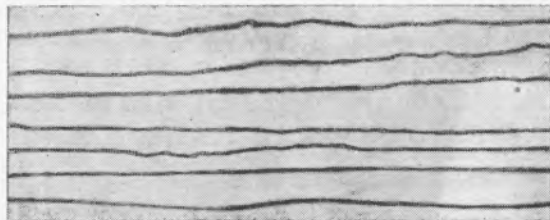


Рис. 1. Миозиновые нити окрашены нильским голубым. Центральный участок до окраски денатурирован нагреванием (3 мин. при 45°)

Нити после промывания спиртом высушиваются до постоянного веса и взвешиваются. Количество связанного красителя в миллиграммах относится к 1 г нитей. В отдельных случаях краситель не извлекается спиртом (конго красный, трипановая синь). Тогда приходится растворять нити в щелочи и фотометрировать краситель в смеси с миозином.

Для окрашивания нитей были взяты из основных красителей: нейтральный красный, сафранин, нильский голубой, метиленовый голубой, толуидиновый голубой, метиловый фиолетовый, малахитовый зеленый; из кислых: конго красный, трипановый синий, цианол, водяной голубой, светлый зеленый, фуксин кислый.

Поглощение красителей нитями зависит от ряда факторов. Многие из них известны и хорошо исследованы для крашения текстильных волокон. Сюда относятся: влияние концентрации красителя в ванне, продолжительность окрашивания, рН ванны, присутствие электролитов, температура ванны, характер и род красителя. Интересной особенностью нитей миозина является зависимость связывания ими красителей от свойств препарата миозина.

Особенно существенно влияние денатурации. Влияние денатурации исследовалось нагреванием и действием мочевины. Для демонстрации влияния денатурации теплом мы поступали следующим образом. Нити получались на большом предметном стекле, которым затем накрывались три рядом стоящих прямоугольных сосуда одинаковой высоты. Центральный сосуд был узким и наполнялся горячей водой; в боковые сосуды доверху наливалась ледяная вода. После охлаждения пластинка с нитью погружалась в раствор красителя. Вскоре было видно преимущественное окрашивание центрального, денатурированного нагреванием участка (рис. 1).

Количество красителя, поглощаемое нитями под влиянием денатурации, как правило, увеличивается и растет с углублением денатурации. В табл. 1 приведены данные по влиянию нагревания и обработки мочевиной на связывание нитями некоторых красителей.

* Окрашенные нити, полученные на стеклянной пластинке и оставленные на воздухе, вскоре высыхают; они неопределенно долго сохраняют окраску и представляют препарат, удобный для демонстрации.

Следует указать, что некоторые препараты миозина давали нити, обнаружившие при денатурации более слабый эффект увеличения связывания красителей, особенно нейтрального красного. Разница в способности нативных и денатурированных нитей связывать красители (особенно нейтральный красный) сглаживается также при хранении миозина. Это зависит, вероятно, от частичной денатурации препаратов белка при его приготовлении и хранении.

Таблица 1

Влияние денатурации на связывание красителей нативными и денатурированными нитями миозина

№ препарата миозина	Род денатурации	Красители					
		нейтральный красный	метиленовый синий	нильский голубой	конго красный	цианол	
		Количество красителя, связанное денатурированными нитями, в % от количества, связанного нативными					
3	Нагревание 10 мин. при	37°	119	126	139	156	136
		45°	134	158	170	204	154
	Действие мочевины	60°	144	168	186	210	164
		2 мин.	116	124	122	134	106
		5 мин.	153	160	151	179	139
5	Нагревание 10 мин. при	37°	104	—	127	—	131
		45°	110	—	—	—	—
	Действие мочевины	60°	114	—	169	—	158
		2 мин.	118	—	130	—	111
		5 мин.	129	—	172	—	130

Весьма своеобразно отношение денатурированных нитей к трифенилметановым красителям. Мы еще раньше установили способность миозина обесцвечивать эти красители. Это свойство миозина заметно



Рис. 2. Миозиновые нити окрашены светлым зеленым. Центральный участок до окраски денатурирован нагреванием (3 мин. при 46°). Ув. $\times 5$

усиливается при его денатурации и связано, вероятно, с наличием в нем сульфгидрильных групп *. При денатурации участка нити на стекле, как описано выше, получают препарат, окрашенный слабее в центре (рис. 2). Этот эффект, кроме светлого зеленого и малахитовой зелени, получается также хорошо с фуксином и водяным голубым.

Нетрудно убедиться в том, что более слабое окрашивание денатурированного участка нити является результатом не более слабого присоединения красителя в этом месте, но именно обесцвечивания красителя:

* Интересно, что, по неопубликованным данным В. Я. Александрова и Д. Н. Насонова, обесцвечивание трифенилметановых красителей сывороткой и яичным белком резко ускоряется уже в самых начальных стадиях денатурации.

если погрузить препарат в раствор кислоты, окраска восстанавливается и в денатурированной полосе становится более интенсивной, чем в нативных участках*.

Это подтверждает наши прежние заключения о том, что обесцвечивание смеси белка с трифенилметановыми красителями является следствием присоединения их друг к другу.

Лаборатория цитологии
Института экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР

Поступило
17 VII 1948

* Этот эффект не получается с малахитовым зеленым.