

О. Д. КУРИЛЕНКО и А. С. ЦЫПЕРОВИЧ

ГИДРАТАЦИЯ И ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СИММЕТРИЯ МОЛЕКУЛ ДЕНАТУРИРОВАННОГО И НАТИВНОГО ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

(Представлено академиком А. В. Палладиным 11 VII 1949)

В изменениях белка, наступающих под влиянием денатурирующего фактора, необходимо различать несколько фаз:

1. Некоторые физико-химические изменения белковых молекул могут предшествовать денатурации. Молекула переходит в «предденатурационное» состояние (1), которое нетрудно отграничить от самой денатурации соответствующими методами.

2. Следующая фаза — собственно денатурация. Для нее характерна скачкообразность (2); молекула переходит из нативной в денатурированную форму без промежуточных состояний.

3. Непосредственно вслед за денатурацией часто происходят дальнейшие изменения белка, как то: агрегация, расщепление и др. (3).

Наибольший интерес в этой совокупности процессов представляет собственно денатурация, так как при ней нарушается то состояние белковой молекулы, с которым связаны важнейшие свойства нативного белка. К сожалению, о природе этого процесса известно весьма мало достоверного. Одной из причин такого положения является то, что исследователи изучали общий итог всех фаз, и получившиеся результаты почти невозможно использовать для характеристики самого денатурационного изменения белковой молекулы.

В Институте биохимии АН УССР были разработаны приемы, позволяющие разграничить отдельные фазы денатурационного процесса. Поэтому в настоящей работе условия опытов могли быть подобраны так, что осложняющие денатурацию явления не играли существенной роли.

В связи с современными взглядами на структуру белковой молекулы большое значение имеет вопрос о гидратации нативного и денатурированного белка и связанный с ним вопрос об электрической симметрии в молекуле протеина. Данные о гидратации, имеющиеся в литературе, не позволяли окончательно установить, каковы изменения молекулы при денатурировании*. Решить этот вопрос можно было путем изучения дисперсии диэлектрической постоянной нативного и денатурированного белка. Такое исследование давало возможность судить и об электрической симметрии молекул. Теоретически представлялось возможным перераспределение полярных групп во время денатурации. Экспериментальных данных по этому вопросу в литературе нет.

* Дю-Нуи в монографии 1945 г. (4) пытается обосновать точку зрения, согласно которой денатурация увеличивает количество гидратационной воды. Другие исследователи (5-7) считают, что в результате денатурационного превращения белок дегидратируется. Во всех перечисленных работах полученные результаты совершенно искажены постденатурационными реакциями, при которых, несомненно, изменяется и гидратация и электрическая симметрия молекул.

Измерения дисперсии диэлектрической постоянной были проведены в Институте общей и неорганической химии АН УССР по методу, описанному ранее (8). Основной методической задачей было избежать «предденатурационных» и, в особенности, «постденатурационных» изменений белковых молекул. Это было возможно при следующей постановке опытов.

Препаратом белка служил яичный альбумин, перекристаллизованный 3—4 раза по Барановскому (9), концентрация белка 1,9—2,0%, рН = 7,0—7,1, продолжительность денатурации 15 мин. при 75°. При этом раствор белка оставался совершенно прозрачным; полнота денатурации контролировалась путем изoeлектрического осаждения и определения количества белка, перешедшего в нерастворимую форму. В опытах с мочевиной к 1 мл раствора белка прибавляли 550 мг сухой мо-

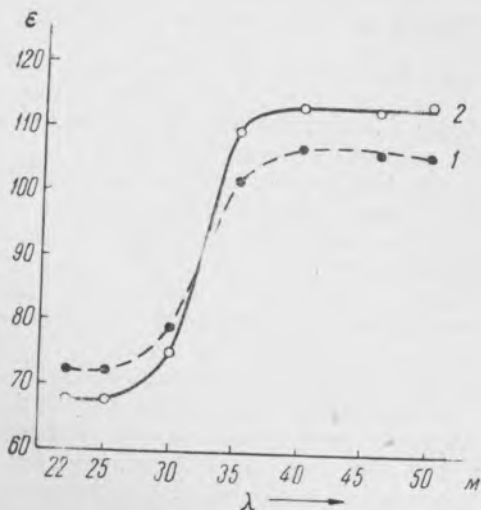


Рис. 1. Зависимость диэлектрической постоянной растворов яичного альбумина от длины волны; 1 — денатурированный белок, 2 — нативный белок

чевины. Температура денатурации 20°, продолжительность наблюдения 6—8 час. Обоснование условий опыта и их подробное описание даны в предыдущих работах, посвященных тепловой денатурации глобулярных белков (10) и их постденатурационным превращениям. Дисперсию диэлектрической постоянной нативного и денатурированного белка измеряли на волнах длиной 50,0; 45,0; 40,0; 35,0; 30,0; 25,0; 22,5 м при температуре $20 \pm 0,1^\circ$. В опытах с мочевиной за ходом денатурации одновременно следили по изменению угла оптического вращения и образованию нерастворимого белка в смеси.

Результаты измерений для тепловой денатурации изображены графически на рис. 1. Из рисунка видно, что диэлектрические постоянные в верхнем участке кривой дисперсии для растворов нативного и денатурированного теплом белка значительно отличаются. То же можно сказать и о нижнем участке кривой дисперсии. Однако для верхнего участка кривой диэлектрическая постоянная раствора денатурированного белка ниже, чем нативного, а для нижнего участка имеет место обратное явление. Эти факты могут быть интерпретированы следующим образом. Уменьшение диэлектрической постоянной в верхнем участке происходит потому, что дипольный момент молекулы денатурированного белка ниже, чем нативного. Увеличение диэлектрической постоянной в нижнем участке объясняется тем, что процесс денатурации сопро-

вождается освобождением (отщеплением) связанной воды. Подсчеты подтверждают эти соображения.

Дипольный момент белка мы рассчитывали по уравнению Дебая в том же виде, как и ранее (11). Мы получили величину 38,5 дебаевских единиц для нативного яичного альбумина и 32,8 — для денатурированного.

Вычислено также количество связанной воды для нативного и денатурированного белка. Расчеты производились по предложенной ранее формуле (12). Количество связанной воды для нативного яичного альбумина найдено равным 0,42 г на 1 г белка, для денатурированного 0,26 г на 1 г белка.

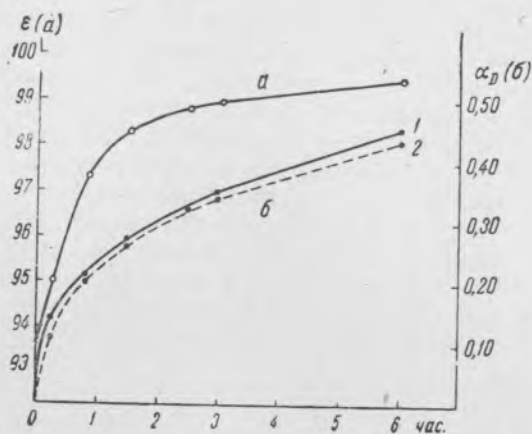


Рис. 2. *a* — изменения диэлектрической постоянной в растворе яичный альбумин — мочевины, *б* — ход денатурации яичного альбумина мочевиной: *1* — изменение оптического вращения, *2* — нарастание количества нерастворимого белка в смеси

Можно было ожидать, что в связи с дегидратацией плотность раствора денатурированного белка уменьшится по сравнению с раствором нативного, так как связанная вода имеет значительно большую плотность, чем свободная. Пикнометрические определения показали, что эта величина в пределах ошибки опыта остается после денатурирования неизменной.

Указанные факты позволяют сделать предположение, что плотность самого яичного альбумина в процессе денатурации меняется в сторону увеличения. Плотность связанной нативным яичным альбумином воды, рассчитанная по предложенной нами формуле (12), оказывается равной 1,7. Если предположить, что в случае денатурированного белка плотность связанной воды остается той же, то возможен количественный расчет плотности самого денатурированного яичного альбумина. Эта величина возрастает от 1,24 для нативного белка до 1,34 для денатурированного.

Время релаксации для нативного яичного альбумина, рассчитанное из приведенных данных, практически совпадает с рассчитанным для денатурированного яичного альбумина. Это означает, что в процессе денатурации молекулярный вес белка не изменяется. По нашим расчетам, он равен около 36 000. Полученная величина примерно совпадает с величинами, установленными на основании измерений другими методами.

Из рис. 2, *a* видно, что в процессе денатурации мочевиной диэлектрическая постоянная система (вода — белок — мочевины) увеличивается. Кинетика денатурации в тех же условиях (рис. 2, *б*) не совпадает с ходом изменения диэлектрической постоянной.

Полученный результат — уменьшение гидратации и увеличение электрической симметрии молекул белка при денатурировании — требует объяснения. Можно высказать следующее предположение: специфически «упакованная» белковая глобула при денатурировании переходит в менее организованное, более хаотическое состояние, связанное с большей свободой взаимодействия ионогенных боковых групп. Взаимодействие их возможно не только между молекулами, но и в пределах одной (денатурированной, развернутой) молекулы. Это взаимодействие и может приводить к новой, неспецифической (по-новому свернутой) конфигурации полипептидных цепей, при которых радикалы противоположного знака взаимодействуют друг с другом и векторная сумма дипольных моментов полярных групп уменьшается. Результатом этого является уменьшение гидратации и увеличение электрической симметрии (несмотря на уменьшение геометрической симметрии, наблюдаемое, например, по вязкости и диффузии). При дальнейшем нагревании наступают межмолекулярные, постденатурационные реакции.

Нарастание диэлектрической постоянной при денатурации мочевиной (в противоположность снижению ее при тепловой денатурации) показывает, что характер и результат обоих процессов совершенно различны (см. также ¹³). Ход изменения дипольного момента во времени не совпадает с ходом денатурации. Возможно, что это обусловлено сложностью системы, содержащей ряд веществ, молекулы которых обладают значительным постоянным дипольным моментом (вода, мочевины, белок в состоянии предденатурации, денатурированный белок).

Институт биохимии
Академии наук УССР

Поступило
1 VII 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Белицер и А. С. Цыперович, Укр. биохим. журн., 20, № 3, 322 (1948). ² А. С. Цыперович, там же, 20, № 1, 108 (1948). ³ Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия, изд. АН СССР, 1940. ⁴ L. du Noüy, The Critical Temperature of Serum (56°), N. Y., 1945. ⁵ S. P. L. Sorensen, C. R. trav. Lab. Carlsb., 12 (1917). ⁶ H. Neurath and H. Bull. Journ. Biol. Chem., 115, 519 (1936). ⁷ H. Bull, Journ. Am. Chem. Soc., 66, 1499 (1944). ⁸ О. Д. Куриленко, Укр. хим. журн., 14, 129 (1948). ⁹ Т. Барановский, ДАН, 28, 723 (1940). ¹⁰ А. С. Цыперович, Укр. биохим. журн., 21, № 1, 44 (1949). ¹¹ А. В. Думанский и О. Д. Куриленко, ДАН, 60, 1197 (1948). ¹² А. В. Думанский и О. Д. Куриленко, Колл. журн., 11, 67 (1949). ¹³ Д. Л. Талмуд, Вестн. АН СССР, № 7, 28 (1947).