

М. П. ЧЕРНИКОВ

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЫЧЬЕГО ПРОКОЛЛАГЕНА

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 5 V 1949)

В. Н. Ореховичем и сотрудниками в течение трех последних лет ведется всестороннее изучение проколлагенов (¹⁻¹²) белков, выделенных в лаборатории из кожи и внутренних органов человека и различных животных в кристаллическом виде.

Наряду с изучением биологических, физико-химических свойств, исследованием распространения данных белков в тканях различных животных (^{13, 14}), проводились работы по исследованию качественного (Н. Е. Плотникова) и количественного аминокислотного состава данных белков. Некоторые из результатов химического изучения проколлагенов помещаются в данной работе.

Проколлаген получался из только что снятой коровьей кожи. Кожа мылась, волосяной покров сбивался, жир и подкожная клетчатка тщательно удалялись, после чего кожа еще раз мылась в токе водопроводной воды и размельчалась в мясорубке после предварительной разрубки на мелкие куски. Полученная кашица использовалась для выделения альбуминов, глобулинов и проколлагена.

После выделения альбуминов и глобулинов экстракцией 1/15 M раствором Na₂HPO₄ кашица промывалась цитратным буфером pH=3,5.

Проколлаген извлекался трехкратным количеством цитратного буфера в течение 3—4 дней при +2°. Во всех случаях для консервирования использовались тимол и толуол.

Аморфный препарат проколлагена получался из цитратного экстракта насыщением его сухим NaCl до 10%. Осадок белка выпадал в виде белых хлопьев, которые собирались на фильтре. Для очистки проколлагена от сопутствующих белков он многократно промывался на фильтре 5% раствором NaCl. Для удаления солей проколлаген взмучивался в 15—20% растворе ацетона с последующим центрифугированием.

Эта операция повторялась до отрицательной реакции на ионы хлора и отрицательной реакции Милона, так как отсутствие тирозина говорит о чистоте препаратов проколлагена. Далее белок высушивался обычным способом ацетоном и эфиром.

Полученный препарат бычьего проколлагена содержал золы 0,47%, азота 17%, углерода 49%, водорода 7%.

Для определения триптофана, тирозина и фенилаланина проводился щелочный гидролиз белка 5 N раствором NaOH в течение 6 час. при слабом кипении на песчаной бане. Щелочь нейтрализовалась 14 N раствором H₂SO₄. Гидролизат доводился до определенного объема и затем фильтровался.

Для определения остальных аминокислот проводился кислотный гидролиз белка 6 N раствором HCl в течение 36 час. на песчаной

бане. Гидролизат после разбавления фильтровался. Соляная кислота удалялась в вакууме, после этого гидролизат доводился до определенного объема.

Для анализа аминокислот мы использовали преимущественно специфические методы, не требующие предварительного разделения аминокислот. Методы проверялись на гидролизатах казеина или желатинины. Во всех случаях (кроме пролина и оксипролина) мы получали вполне удовлетворительные результаты.

Триптофан⁽¹⁵⁾, тирозин⁽¹⁶⁾, фенилаланин⁽¹⁷⁾, метионин⁽¹⁸⁾, цистин и цистеин⁽¹⁹⁾, пролин и оксипролин⁽²⁰⁾ определялись колориметрически. Гликоколл и аланин окислением нингидрином с последующим колориметрическим определением полученных альдегидов^(21,22). Аргинин, гистидин, лизин, аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты определялись энзиматическим методом^(23,24) *.

Определения проводились на штупфенфотометре или на абсорбциометре Спеккера.

Результаты наших исследований сведены в табл. 1. В этой же таблице приведен аминокислотный состав коллагена и желатинины (по литературным данным).

Т а б л и ц а 1

Аминокислоты	В % к сухому беззольному белку		
	Коллаген ⁽²⁴⁾	Проколлаген	Желатина ⁽²⁴⁾
Триптофан	0,0	0,0	0,0
Тирозин	1,4	0,0	0,44
Фенилаланин	4,2	2,3	2,2
Аргинин	8,8	9,2	8,0
Лизин	4,5	4,6	4,1
Гистидин	0,8	2,9	0,79
Аспарагиновая к-та	6,3	5,2	6,7
Глутаминовая к-та	11,3	11,0	11,5
Цистин }	0,0	0,0	0,07
Цистеин }			
Метионин	0,8	0,66	0,61*
Гликоколл	26,2	28,0	25,5
Аланин	9,5	9,5	8,7
Пролин	15,1	(20)	19,7
Оксипролин	14,0		14,4

* По нашим данным, в желатине из кожи телянка.

При сравнении проколлагена и коллагена по аминокислотному составу можно видеть, что они содержат одинаковые количества лизина, глутаминовой кислоты, аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, метионина и гликоколла и оба не содержат триптофана, цистина и цистеина.

Проколлаген и коллаген различаются по содержанию фенилаланина, гистидина, пролина и оксипролина. Проколлаген в отличие от коллагена не содержит тирозина.

Проколлаген также отличается по аминокислотному составу от желатинины, что видно из приведенных в таблице данных. Они содержат разные количества гистидина, аргинина, аспарагиновой кислоты, пролина и оксипролина, кроме того, желатина содержит тирозин, а проколлаген его не содержит.

* В лаборатории Б. И. Збарского.

Таким образом, на основании наших данных можно сказать, что проколлаген по аминокислотному составу близок к коллагену и желатине, но не идентичен им, являясь индивидуальным соединительнотканевым белком типа коллагена.

За ценные указания и повседневное руководство в проведении данной работы приношу глубокую благодарность проф. В. Н. Ореховичу.

Институт биологической и
медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
4 V 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Н. Орехович, Биохимия, 3, 456, 616 (1938). ² В. Н. Орехович, Биохимия, 5, 331 (1940). ³ В. Н. Орехович и Т. П. Соколова, ДАН, 28, 747 (1940). ⁴ В. Н. Орехович, Диссертация, 1940; автореферат, Арх. биол. наук, 61, 119 (1941). ⁵ В. Н. Орехович, Am. Rev. Sov. Med., 6, 517 (1944). ⁶ В. Н. Орехович, К. И. Страцицкий и К. Д. Орехович, Булл. эксп. биол. и мед., 22, 60 (1946). ⁷ В. Н. Орехович, там же, 22, 57 (1946). ⁸ В. Н. Орехович и А. А. Тустановский, там же, 23, 197 (1947). ⁹ В. Н. Орехович, А. А. Тустановский и К. Д. Орехович, ДАН, 57, 475 (1947). ¹⁰ А. А. Тустановский, Биохимия, 12, 285 (1947). ¹¹ В. Н. Орехович, А. А. Тустановский, К. Д. Орехович и Н. Е. Плотникова, Биохимия, 13, 56 (1948). ¹² В. Н. Орехович, Усп. хим., 26, 690 (1947). ¹³ Н. Е. Плотникова, ДАН, 58, 1715 (1947). ¹⁴ Н. Е. Плотникова, ДАН, 66, № 6 (1949). ¹⁵ M. I. Horn and D. V. Jones, Journ. Biol. Chem., 157, 153 (1945). ¹⁶ L. E. Thomas, Arch. Bioch., 5, 175 (1945). ¹⁷ W. C. Hess and M. X. Sullivan, *ibid.*, 5, 165 (1945). ¹⁸ T. E. McCarthy and M. X. Sullivan, Journ. Biol. Chem., 141, 871 (1941). ¹⁹ K. Nakamura and F. Binkley, *ibid.*, 173, 407 (1948). ²⁰ G. H. Guest, Canad. Journ. Research Sec., B, 17, 144 (1939). ²¹ B. Alexander, A. Seligman, Journ. Biol. Chem., 159, 9 (1945). ²² А. Е. Браунштейн и Бычков, Биохимия, 8, в. 5—6 (1943). ²³ Б. И. Збарский, И. Б. Збарский и С. Р. Мардашев, Биохимия, 9, 161 (1944). ²⁴ С. Р. Мардашев и В. Н. Гладкова, Биохимия, 13, 315 (1948). ²⁵ I. H. Bowes and R. H. Kenten, Biochem. Journ., 43, 3 (1948). ²⁶ E. J. Cohn and J. T. Edsalle, Proteins, Amino-Acids and Peptides, 1943, p. 358. ²⁷ C. E. Graham, H. K. Waitkoff and W. Hier, Journ. Biol. Chem., 177, 529 (1949).