

В. С. ТОНГУР и В. И. КАСАТОЧКИН

ОБРАТИМОСТЬ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКА ПОД ДАВЛЕНИЕМ

(Представлено академиком П. А. Ребиндером 14 VII 1950)

Природа явления денатурации, несмотря на его важное значение для биологии и медицины, остается до настоящего времени невыясненной. С точки зрения выяснения молекулярного механизма процесса представляют большой интерес исследования кинетики тепловой денатурации. Однако в ряде кинетических исследований комплексный характер процесса денатурации не позволил пока сделать однозначные выводы о механизме процесса. Одним из нас⁽¹⁻³⁾ был обнаружен эффект задержки и обращения тепловой денатурации (ренатурация) растворов яичного белка и сывороточного альбумина под давлением 1000—3000 атм. по всем изученным свойствам: растворимости, вязкости, углу вращения, плоскости поляризации, а также по перевариваемости трипсином.

Эффект обращения денатурации может быть объяснен предположением о равновесии между нативной и денатурированной формой белка, зависящем от температуры и давления. При условии истинной обратимости этот эффект открывает возможность прямого изучения термодинамики денатурации и, следовательно, нового подхода к выяснению физико-химической природы денатурации.

Измерениями равновесных концентраций при различных температурах и давлениях, а также прямым расчетом ряда термодинамических величин, изложенным в данной работе, подтверждается наше предположение об обратимости процесса денатурации и наличии равновесия между нативной и денатурированной формами белка.

В качестве объекта исследования был избран кристаллический альбумин сыворотки крови человека, полученный по методу Барановского. Опыты проводились с однопроцентным раствором белка в фосфатном буфере с рН 6,0. Методика опытов заключалась в следующем. Пробирка с резиновой пробкой, содержащая раствор белка, помещалась, для лучшей изоляции, в резиновый мешочек и опускалась в предварительно нагретую бомбу высокого давления. В течение 2—3 мин. устанавливалось требуемое гидростатическое давление, под которым образцы выдерживались в течение 1 часа. Температура регулировалась контактными термометром через реле с точностью до 0,2°.

В этой же бомбе производилось контрольное нагревание раствора белка при атмосферном давлении. Контроль количества проденатурированного белка производился двумя методами: определением количества азота по микрокельдалю в фильтрате образца, предварительно доведенного до изоэлектрической точки, и измерением мутности стандартно разбавленных растворов белка на микрофотометре Цейсса с нефелометрической насадкой и непосредственным пересчетом на

коэффициент экстинкции. Последний метод был использован нами для контроля относительных изменений степени денатурации белка. Кроме описанных опытов по одновременному нагреванию и действию давления, были также проведены опыты по ренатурации под давлением 1000 атм. при температуре 20° предварительно нагретого и приблизительно на половину проденатурировавшего белка. В этих опытах образцы растворов денатурируемого белка выдерживались под давлением длительное время (до 70 час.) для достижения равновесия.

Представляя денатурацию как мономолекулярный ⁽³⁾ обратимый процесс, можно написать равновесие: нативный белок \rightleftharpoons денатурированный белок и константу равновесия

$$K = \frac{c_0 - c}{c},$$

где c_0 — общая концентрация белка и c — равновесная концентрация нативного белка.

Из известного соотношения

$$\Delta F = -RT \ln K$$

может быть определена свободная энергия денатурации ΔF , а из температурной зависимости константы равновесия

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_P = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

тепловой эффект денатурации ΔH .

Энтропия ΔS может быть определена как из соотношения

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S,$$

так и из температурной зависимости свободной энергии

$$\Delta S = - \left(\frac{\partial \Delta F}{\partial T} \right)_P.$$

Кроме того, пользуясь зависимостью константы равновесия от давления

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial P} \right)_T = - \frac{\Delta v}{RT},$$

можно было найти среднюю величину изменения молярного объема белка при денатурации Δv .

В табл. 1 приводятся результаты определения равновесных концентраций нативного белка c , а также расчетов K , ΔF , ΔH , ΔS и Δv . Числа, заключенные в скобки, определяют соответствующие величины, найденные в предположении средней величины теплового эффекта.

Таблица 1

P, атм.	1000	2000		2500	
		343,5	351,4	343,5	351,4
T, °K	293				
c, %	85,8	16,0	8,0	34,0	19,0
K	0,165	5,25	11,5	1,95	4,26
ΔF , кал/г · моль	+1635	-1133	-1706	-457	-1012
ΔH , кал/г · моль	[24000]				
ΔS , кал/г · моль · град.	[76,3]	73,0	73,0	71,2	71,3

$$P = 2000 - 2500$$

$$T = 343,5$$

$$P = 2000 - 2500$$

$$T = 351,4$$

$$\Delta v = 59,0 \text{ см}^3/\text{г} \cdot \text{моль}$$

$$\Delta v = 61,0 \text{ см}^3/\text{г} \cdot \text{моль}$$

Самый факт смещения равновесия в сторону нативного белка под давлением следует объяснить возрастанием молярного объема белка в процессе денатурации. Найденное нами приращение молярного объема в интервале давлений 2000—2500 атм. значительно меньше величины приращения объема при атмосферном давлении $\Delta v = 105 \text{ см}^3/\text{г} \cdot \text{моль}$, измеренной Гейманом ⁽⁴⁾ дилатометрически.

На рис. 1 изображены результаты опытов по исследованию изменений мутности растворов белка в зависимости от давления (до 7000 атм.) при $t = 20^\circ, 70,5^\circ, 78,4^\circ$.

Мутность нагретых растворов белка при давлении выше 1000 атм. быстро снижается с увеличением давления из-за смещения равновесия в сторону нативного белка. В области давлений выше 5000 атм. белок денатурирует под влиянием высокого давления, и мутность растворов белка возрастает.

Характерно, что начальное давление, необходимое для денатурации, возрастает с увеличением температуры. Таким образом, в области высоких давлений с повышением температуры денатурация в большой степени затруднена. Этот эффект может быть объяснен переменной знака изменения константы равновесия денатурации с давлением в области высоких давлений в результате неодинаковой сжимаемости нативного и денатурированного белка.

Известные величины термодинамических функций позволяют произвести расчет константы равновесия и равновесных концентраций денатурировавшего белка для любых давлений и температур. Однако для такого расчета необходимо знание изменения молярного объема белка при денатурации в функции давления. Не располагая данными по сжимаемости белка, для приближенного расчета мы приняли линейную зависимость приращения молярного объема при денатурации от давления, используя дилатометрически измеренную величину приращения объема при атмосферном давлении и вычисленную нами величину приращения объема при давлении в интервале 2000—2500 атм. (см. рис. 2).

В этом приближении точка инверсии приращения объема (точка пересечения с осью давлений) примерно отвечает значению наблюдаемого начального давления возрастания мутности. Следует считать, что именно инверсия приращения объема является основной причиной денатурации белка при высоких давлениях.

Рассчитанная кривая равновесных концентраций денатурированного белка в функции давления, изображенная на рис. 3, по своему характеру достаточно хорошо воспроизводит кривую мутности растворов белка (рис. 1). Экстраполяция констант равновесия, по которым рассчитывались концентрации денатурированного белка, была произведена по уравнению

$$\lg K_2 = \lg K_1 - \frac{\Delta v}{2,3 RT} (P_2 - P_1),$$

где Δv — среднее приращение объема белка в интервале давлений от P_1 до P_2 . Точный расчет равновесного состояния белка при нор-

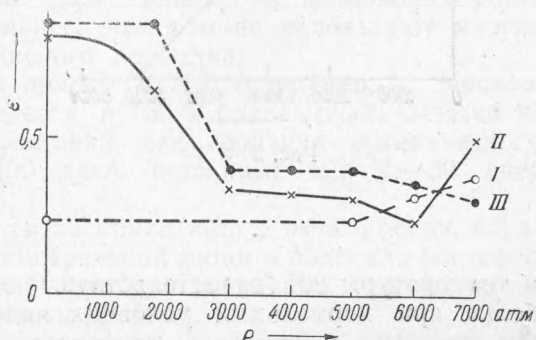


Рис. 1. Изменение мутности раствора белка в зависимости от давления: I — при 20° , II — при $70,5^\circ$, III — при $78,4^\circ$.

мальных условиях требует более точных экстраполяционных уравнений.

Рассчитанные нами приближенные величины константы равновесия, свободной энергии и энтропии денатурации для атмосферного давления

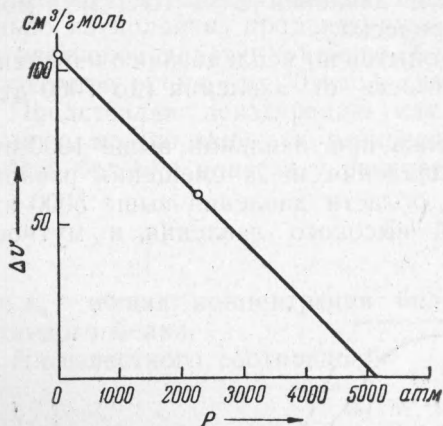


Рис. 2

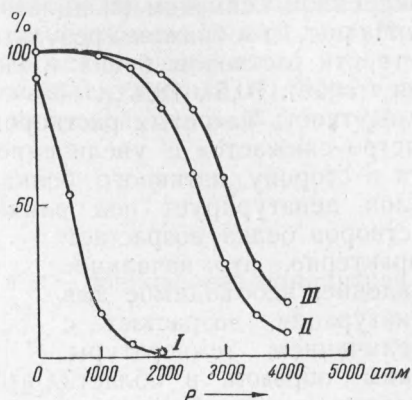


Рис. 3. Равновесные концентрации денатурированного белка в зависимости от давления: I — при 20°, II — при 70,5°, III — при 78,4°

и температуры 20° свидетельствуют о том, что устойчивой формой белка при нормальных условиях является денатурированная форма (см. рис. 3).

Институт питания
Академии медицинских наук СССР и
Московский фармацевтический институт

Поступило
27 VI 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Тонгур, Бюлл. эксп. биол. и мед., **26**, 440 (1948). ² В. С. Тонгур, Колл. журн., **11**, 274 (1949). ³ В. С. Тонгур и Н. А. Казмина, Биохимия, **15**, 221 (1950). ⁴ Е. Неуманн, Biochem. Jour., **30**, 127 (1936).