

Г. К. ШИПИЦЫНА и И. И. ДУБРОВСКАЯ

О ГЕКСОЗАМИНЕ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 17 III 1951)

Для определения гексозамина в биологических препаратах широко применяют метод Эльсон и Моргана (1), отличающийся большой простотой. Эта реакция, по данным авторов, основана на превращении гексозамина в N-моноацетилпроизводное (3-ацетил-2-метил-5-тетрагидроксibuтилпиррол), которое позволяет получить стойко окрашенный продукт при конденсации с *n*-диметиламинобензальдегидом.

Пользуясь этой реакцией при химическом исследовании некоторых микробов, мы установили, что не только специфические полисахариды и антигены, но и нуклеопротеиды бактерий обнаруживают при соответствующей обработке характерное для гексозамина окрашивание. Предполагая, что в препаратах нуклеопротеидов содержится примесь специфических полисахаридов, мы для их удаления подвергали белки многократной обработке по методу Уайта (2). Однако даже после 5-кратного извлечения слабой уксусной кислотой препараты белков давали положительную реакцию на гексозамин (см. табл. 1).

Таблица 1

Содержание гексозамина в бактериальных нуклеопротеидах

П р е п а р а т	Содержание гексозамина в %	
	в исходном препарате	после 5-кратной обработки 0,1 N CH ₃ COOH
Нуклеопротеид из <i>Bacteriella Suis</i>	7,35	7,10
Нуклеопротеид из <i>B. tularensis</i>	5,33	4,30

После этого мы решили подвергнуть аналогичному исследованию белковые препараты различного происхождения. Для этой цели использовались как аморфные, так и кристаллические белки *. Подобно полисахаридам, белки гидролизовались нормальной серной кислотой в течение 4 и 7 час. в кипящей водяной бане. Различные сроки гидролиза обусловлены тем, что при работе с некоторыми бактериальными полисахаридами при 7-часовом гидролизе (рекомендуемом в литературе) нами наблюдалось заметное уменьшение количества редуцирующих сахаров и гексозамина по сравнению с результатами гидролиза меньшей продолжительности.

По окончании гидролиза нерастворившаяся часть отделялась центрифугированием. Гидролизаты в количестве 1 мл помещались в пробирки, градуированные на 10 мл, и нейтрализовались обезвоженной содой. Туда же добавлялся 1 мл раствора ацетилацетона (1 мл ацетилацетона в 50 мл 0,5 N раствора соды) и стенки пробирок ополаскивались 1 мл воды. Пробирки помещались на 15 мин. в кипящую

* Белки любезно предоставлены нам проф. А. Н. Белозерским и К. И. Страцицким.

водяную баню. После охлаждения приливалось 6 мл 96% спирта, 1 мл реактива Эрлиха (0,8 г *l*-диметиламинобензальдегида в 30 мл концентрированной соляной кислоты и 30 мл 96% спирта). Объем доводился крепким спиртом до 10 мл, содержимое пробирок перемешивалось и колориметрировалось через 30 мин. на электрофотоколориметре с синевioletовым фильтром 420—440 мμ. Количество глюкозамина рассчитывалось по стандартной кривой, полученной нами на основании измерения интенсивности окраски химически чистого солянокислого глюкозамина в разведении от 0,025 до 1,6 мг в 1 мл. Результаты исследования гидролизатов белков представлены в табл. 2. Без предварительного ацелирования образования окраски не наблюдалось.

Таблица 2

Исследование гидролизатов белков в условиях гексозаминовой реакции

Препараты белка	Показания колориметра		„Гексозамин“ * в % к навеске	
	4-час. гидролизаты	7-час. гидролизаты	через 4 часа	через 7 час.
Химотрипсиноген кристаллич.	72	44	3,3	8,8
Пепсин кристаллич.	68	45	4,2	8,65
Проколлаген кристаллич.	73	73	3,25	3,25
Трипсин кристаллич.	71	55	3,35	6,8
Гольевой порошок	60	64	5,7	5,0
Коллаген из кожи крыс	64	70	5,0	3,8
Желатина			Нехарактерная окраска	
Яичный альбумин кристаллич.	78	71	2,25	3,5
Сывороточный альбумин кристаллич.	68	71	4,2	3,5
Актомиозин 3 раза переосажденный	78	78	2,25	2,25
Казеин	71	66	3,4	4,5
Эдестин			Нехарактерная окраска	
Глиадин	76	63	2,6	5,15
Глобулин из семян тыквы	70	60	3,8	5,7
Легумин из семян гороха	65	70	4,8	3,8
Вицеллин из гороха	78	66	2,25	4,6
Глицинин из соев	55	74	6,75	3,05
α — β-конглоутин	47	76	8,3	2,6
Глобулин из кедровых орехов	50	55	6,2	6,8

* Для большей наглядности на основании интенсивности реакции здесь высчитано содержание гексозамина в % к навеске. Название „гексозамин“ употребляется нами условно. Ниже будет показано, что получаемая окраска может быть вызвана не только гексозамином.

Из табл. 2 видно, что исследованные белковые гидролизаты, за исключением эдестина и желатины, давали резко положительную реакцию на гексозамин. Некоторые белки давали окраску большей интенсивности при менее продолжительном гидролизе (глицинин, α — β-конглоутин, легумин, гольевой порошок, коллаген, сывороточный альбумин).

Можно было предположить, что все исследованные нами препараты белков содержат гексозамин, о чем имеются многочисленные указания в литературе (3-6).

Однако прежде чем приписать наличие положительной реакции гексозамину, мы решили проверить, не появляется ли аналогичное окрашивание с получающимися в этих условиях продуктами гидролиза белка. С этой целью нами исследовались различные аминокислоты, моносахариды и сочетания аминокислот с сахарами. Без предваритель-

ного ацетилирования ни в одном случае характерной окраски не наблюдалось. После ацетилирования при добавлении реактива Эрлиха смеси аминокислот с сахарами давали яркое характерное окрашивание. Все опыты проводились с равными весовыми количествами аминокислот и сахаров. В градуированные на 10 мл пробирки помещалось по 5 мг аминокислоты и сахара или только один из этих компонентов. Вещества растворялись в 1 мл воды. Дальше реакция проводилась, как указано ранее. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Испытание перечисленных аминокислот в отсутствие сахаров давало в условиях опыта нехарактерное, желто-зеленое окрашивание. Опыты, проведенные с сахарами в отсутствие аминокислот, показали, что испытанные нами галактоза, фруктоза, арабиноза и рамноза давали слабую, не поддающуюся измерениям окраску. Среди перечисленных сахаров фруктоза давала несколько более яркую окраску.

Следует указать, что в случае сочетания фруктозы с аминокислотами везде появлялось более интенсивное окрашивание, чем с галактозой. Наиболее яркое красное окрашивание дало сочетание моносахаридов с лизином.

Во время оформления данной работы в печати появилось сообщение Хоровица, Икава и Флинг (7), в котором авторы, исследуя синтез гексозамина нейроспорой, также обнаружили положительную реакцию Эльсон и Моргана при смешивании моносахаридов с аминокислотами. В связи с этим нам следовало установить, содержатся ли в гидролизатах белков аминокислоты и углеводы. Появление аминокислот после 4- и 7-часового гидролиза белков нормальной серной кислотой доказывалось качественными реакциями на некоторые аминокислоты. Обнаружены положительные реакции на гистидин, триптофан, пролин, цистин, цистеин и фенилаланин. Определение общего азота в гидролизатах показало значительную степень расщепления белков. Глубина гидролиза характеризуется содержанием общего азота в гидролизатах (см. табл. 4). Приведенные данные показывают, что при гидролизе в раствор переходит от 50 до 90% от общего азота белка.

По литературным данным, положительная реакция Молиша указывает, что многие белки содержат углеводы как составную часть белковой молекулы (4, 5, 8, 9).

Применяя орциновый метод определения углеводов в белках, Зеренсен (10) обнаружил наличие углеводов не только в сыровоточных белках и очищенном казеине, но и в многократно переосажденном глиадине пшеницы.

Так, кристаллический альбумин содержал 0,47% углеводов, глобулин 1,82%, казеин 0,31% и глиадин 0,20%. Все исследованные нами белки давали интенсивную реакцию Молиша на углеводы. Кроме того, некоторые из них обнаружили положительную реакцию Селиванова.

Таблица 3

Интенсивность окраски смеси аминокислот с сахарами в условиях реакции на гексозамин

Аминокислоты	Показания колориметра		"Гексозамин" в %	
	с фруктозой	с галактозой	с фруктозой	с галактозой
Валин	78	88	1,75	0,6
Глутаминовая кислота	78	88	1,7	0,6
Фенилаланин	71	80	3,2	1,4
Аланин	73	76	2,9	2,1
Лизин	58	68	8,4	5,6
Пролин	85	92	1,0	следы
Тирозин	73	76	2,9	2,1
Лейцин	74	80	2,6	1,4
Норлейцин	76	85	2,1	1,0
Триптофан	76	80	2,1	1,4

Характеристика степени гидролиза белков по общему азоту

Белок	% общего азота гидролизата от общего азота белка		Белок	% общего азота гидролизата от общего азота белка	
	через 4 часа	через 7 час.		через 4 часа	через 7 час.
Казеин	79,5	85,0	Проколлаген	84,5	86,0
Легумин	62,6	80,4	Актомиозин	73,6	77,9
Вицеллин	75,3	90,6	Сывороточный альбумин	62,5	62,6
Глобулин тыквы	50,1	72,8	Эдестин	78,0	78,0
Глиадин	47,0	63,1	Желатина	84,0	89,6
Глицинин сои	60,0	72,3	Гольевой порошок	72,2	79,4
Яичный альбумин	76,6	77,7			

Результаты проведенного нами исследования указывают, что в биологических объектах положительная красочная реакция на гексозамин в условиях метода Эльсон и Моргана не отражает действительного количественного и даже качественного наличия гексозамина. Опыты с чистыми аминокислотами и сахарами показали, что благодаря взаимодействию между ними образуется характерное окрашивание, не отличающееся от окраски, обусловленной химически чистым глюкозаминном.

Из сказанного следует сделать вывод, что положительная реакция Эльсон и Моргана на гексозамин в гидролизатах белков и ряде других биологических препаратов обусловлена не только наличием гексозамина. Более того: реакция может быть резко положительной при полном отсутствии гексозамина, но при наличии простых сахаров и аминокислот. Таким образом, вопрос о наличии гексозамина в белках, гидролизатах, антигенах и т. д. может быть решен только путем препаративного выделения гексозамина, как это было показано для ряда глюकोпротеидов (⁴, ⁵, ⁸, ⁹), или после разработки метода более тщательного отделения гексозамина или отыскания более специфической цветной реакции.

Опубликованный недавно Дише (¹¹) метод колориметрического определения гексозаминов в присутствии индола является хотя и более чувствительным (обнаруживается около 5 γ вещества), но при значительной сложности выполнения также не отличается достаточной специфичностью. Таким образом, при работе с биологическими препаратами, содержащими белки или свободные аминокислоты и углеводы, следует рекомендовать осторожность в трактовке получаемых результатов. Только в случае чистых полисахаридов можно говорить о достоверности данных по количественному содержанию гексозамина.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалея
Академии медицинских наук СССР

Поступило
12 III 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Elson and W. Morgan, *Biochem. Journ.*, 27, 1824 (1933). ² A. White, *Journ. Path. and Bact.*, 32, 85 (1929). ³ H. Masamune and V. Nagazuni, *Journ. Biol. Chem.*, 26, 223 (1937). ⁴ Cl. Rimington, *Biochem. Journ.*, 25, 1062 (1931). ⁵ P. A. Levene and T. Mori, *Journ. Biol. Chem.*, 81, 49 (1929). ⁶ L. Hewitt, *Biochem. Journ.*, 30, 2229 (1937). ⁷ H. Horowitz, R. Ikawa and M. Fling, *Arch. Biochem.*, 25, 226 (1950). ⁸ P. A. Levene and A. Rotten, *Journ. Biol. Chem.*, 81, 63 (1929). ⁹ H. Bierry, *C. R.*, 204, 1681 (1937). ¹⁰ M. Sørensen u. G. Haugaard, *Biochem. Zs.*, 260, 247 (1933). ¹¹ Z. Dische and E. Borenfreund, *Journ. Biol. Chem.*, 184, 517 (1950).