

Б. А. ТАЛМУД

ВНУТРИГЛОБУЛЯРНОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ ГИДРОФОБНЫХ ВЕЩЕСТВ БЕЛКАМИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 VI 1951)

Много исследований посвящено взаимодействию белков с органическими веществами ионного характера и, в частности, с основными и кислыми красителями. Во всех этих исследованиях рассматривалось взаимодействие небелковых веществ с ионогенными боковыми цепями или концевыми группами белков. Но взаимодействие белков с веществами неполярного характера, которые, естественно думать, связываются с гидрофобными боковыми цепями глобулярного ядра, изучено очень мало.

В то время как внутримицеллярному поглощению неполярных веществ мылами посвящена обширная литература ⁽¹⁾, аналогичному, в известной мере, внутриглобулярному поглощению неполярных веществ белками посвящено очень мало работ ⁽²⁾.

Согласно современным представлениям о природе глобулярных белков ⁽³⁾, неполярные боковые цепи образуют ядро молекулы глобулярного белка, оболочкой которого является полипептидная цепь главных валентностей с полярными боковыми цепями, направленными в окружающую водную среду. В отличие от мыльных мицелл, ядро которых состоит из неполярных цепей отдельных небольших молекул, ядро белковой глобулы состоит из неполярных боковых цепей, связанных в белковую макромолекулу. Поэтому, когда мыльная мицелла поглощает неполярное вещество, то по мере роста ее ядра наращивается и общее число входящих в мицеллу молекул жирной кислоты, образующих вокруг ядра адсорбционный слой. Поглощение неполярных веществ молекулой глобулярного белка ограничивается увеличением ядра только за счет поглощенного вещества, так как все аминокислотные остатки белковой молекулы соединены воедино цепью главных валентностей. Благодаря тому, что витки спиралевидной глобулы соединены друг с другом водородными связями, образуя более или менее жесткий каркас, набухание глобулярного ядра может быть только очень ограниченным. Если же добавить вещество, разрывающее водородные связи, например мочевины, то раздвигание витков спирали облегчится, и в ядро проникнет добавочное количество гидрофобного вещества. Но и это увеличение должно иметь свой предел. Разрыв водородных связей одновременно ведет к разветвлению спиралевидной глобулы за счет сил электростатического отталкивания между одноименно заряженными боковыми цепями, не уравновешенными больше силами сцепления. Растяжение белковой глобулы, отдаляя друг от друга неполярные боковые цепи, должно вызывать ослабление ван-дер-ваальсовых сил между ними и вследствие этого постепенное уменьшение способности белка поглощать новые порции гидрофобных веществ. Кроме того, возможно образование комплексов

между неполярными боковыми цепями и мочевиной⁽⁴⁾, что тоже может вести к уменьшению поглощения гидрофобных веществ.

Для экспериментальной проверки изложенных соображений удобно воспользоваться гидрофобными нерастворимыми в воде красителями, поглощение которых растворами белка легко контролировать колориметрически. В качестве вещества, вызывающего разрыв водородных связей и облегчающего доступ красителю в ядро глобулы, бралась мочевина. Из ряда исследований⁽⁵⁾ известно, что мочевина вытесняет краситель, связанный с белком. Но это относится к тем случаям, когда белок присоединяет к себе растворимые в воде кислые или основные красители, которые связываются анионными или катионными боковыми цепями белка. В случае взаимодействия белков с нерастворимыми в воде гидрофобными красителями поглощение их от прибавления мочевины должно вначале усиливаться, а затем уменьшаться. Такие денатурирующие агенты, как щелочь и кислота, также по-разному влияют на поглощение ионных и неполярных красителей. Ионные красители, поглощенные белком, вытесняются кислотой и щелочью, неполярные же красители не только не вытесняются, но сильнее поглощаются.

Нельзя считать, что растворимые в воде ионные красители совершенно не способны проникать в ядро глобулы. Если в молекуле красителя гидрофобная часть заметно превалирует, то при некоторых условиях возможно проникновение ее в ядро глобулы. Описан случай⁽⁶⁾, когда сывороточный альбумин поглощал краситель оранж I ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \langle \text{ } \rangle - \text{N} = \text{N} - \langle \text{ } \rangle - \text{OH}$) в виде стадии. Сразу после

обработки белка красителем поглощалось количество молекул оранжа,

соответствующее числу катионных групп белка, а через несколько недель еще такое же примерно количество красителя. Краситель, поглощенный в первую стадию, вытесняется при действии денатурирующих агентов (тепла, щелочей) и пепсина. Белок, поглотивший одну порцию оранжа, расщепляется пепсином так же, как и неокрашенный. После дополнительного поглощения красителя белок теряет способность расщепляться пепсином.

Автор этой работы не дает объяснения двум типам поглощения красителя, считая лишь, что образующаяся будто бы сплошная пленка красителя защищает белковую молекулу от действия пепсина. Гораздо проще объяснить этот интересный факт тем, что

дополнительная порция поглощается внутриглобулярно и, стабилизируя глобулу, препятствует доступу фермента к пептидным связям.

Ниже излагается исследование поглощения белком гидрофобных нерастворимых в воде красителей азобензола $\langle \text{ } \rangle - \text{N} = \text{N} - \langle \text{ } \rangle$ и судана III.

1% раствор сывороточного альбумина или глобулина свежеприготовленного, не защищенного толуолом, тщательно перемешивался с измельченным в тонкий порошок транс-азобензолом. После того как краситель был отфильтрован, фильтрат, содержащий окрашенный белок, встряхивался с толуолом до полного обесцвечивания белка. Образующаяся при этом эмульсия расслаивалась центрифугированием. Количество извлеченного красителя определялось с помощью электрофотоколориметра.

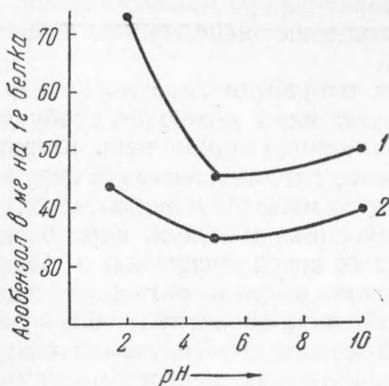


Рис. 1. Кривые зависимости поглощенного азобензола от pH раствора. 1 — 1% сывороточный альбумин, 2 — 1% сывороточный глобулин

Время, необходимое для максимального поглощения красителя, определялось особой серией опытов.

Этим путем было измерено поглощение азобензола белками в зависимости от pH раствора. На рис. 1 изображены соответствующие кривые. При pH 1,4—2, т. е. при pH, далеко отстоящих от границы стабильности этих белков (pH 4), когда, по видимому, происходит заметное разворачивание глобул, поглощение красителя имеет довольно значительную величину. При pH, близком к изоэлектрической точке, поглощение проходит через минимум, вновь возрастая по мере удаления в щелочную область.

Далее было исследовано поглощение красителя белками в присутствии мочевины. При этом, конечно, вычиталось то незначительное количество красителя, которое поглощается растворами самой мочевины. На рис. 2 изображены кривые зависимости поглощения азобензола растворами сывороточного альбумина и глобулина от концентрации мочевины при pH 5. Как видно, ход поглощения красителя белками совпадает с ожидаемым, а именно: 2—3 M концентрация мочевины вызывает максимальное поглощение красителя, с возрастанием концентрации мочевины поглощение красителя падает. Такой же характер имеет поглощение белковыми растворами красителя судан III. Но в этом случае не удается полное извлечение судана толуолом даже после трехкратного повторения.

Это свидетельствует о том, что судан прочнее удерживается белком, чем азобензол, что, возможно, связано с большой величиной гидрофобной молекулы судана.

Можно было ожидать, что увеличение симметрии глобулы уменьшит ее способность поглощать гидрофобный краситель. Как было показано

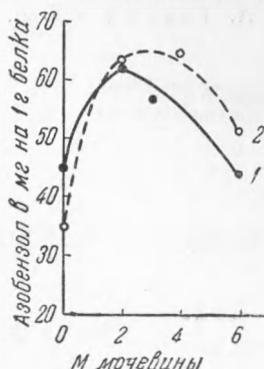


Рис. 2. Кривые зависимости поглощенного азобензола от молекулярной концентрации мочевины. 1—1% сывороточный альбумин, 2—1% сывороточный глобулин

Таблица 1

	Поглощение азобензола в мг на 1 г белка	Поглощение азобензола в мол. на 1 моль белка
1% сывороточный альбумин в 2 M мочеvine . .	63	24
1% сывороточный альбумин	45,5	17,5
1% сывороточный альбумин в 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ .	31	13

раньше (7), повышение симметрии белковой глобулы может быть достигнуто действием концентрированных растворов нейтральных солей, уменьшающих силы электростатического отталкивания и тем самым улучшающих «глобулирование». Опыт подтвердил это ожидание (см. табл. 1).

Влияние поглощенных белками гидрофобных веществ на атакуемость белков ферментами, так же как влияние поглощенных ферментными белками гидрофобных веществ на ферментативную активность, является предметом дальнейших исследований.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. В. Klevens, Chem. Rev., 47, 1 (1950). ² Д. Л. Талмуд, ЖФХ, 15, 532 (1931); С. Е. Бреслер, Биохимия, 14, 180 (1949). ³ С. Е. Бреслер и Д. Л. Талмуд, ДАН, 43, 362, 367 (1944); Д. Л. Талмуд, Совещание по белку, 18, 1948; С. Е. Бреслер, Биохимия, 14 (1949). ⁴ W. Schlenk jr., Lieb. An., 565, 204 (1949). ⁵ Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия 1940, стр. 84; I. M. Klotz, H. Triwush and F. M. Walker, JACS, 70, 29, 2935 (1948). ⁶ V. Carroll, JACS, 72, 2763 (1950). ⁷ П. В. Афанасьев, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, ДАН, 55, 615 (1947).