Доклады Академии Наук СССР
1952. Том LXXXIV. № 5

БИОХИМИЯ

С. Е. БРЕСЛЕР и Н. А. СЕЛЕЗНЕВА

О КРИСТАЛЛИЗАЦИИ РЕСИНТЕЗИРОВАННОГО БЕЛКА

(Представлено академиком А. Ф. Иоффе 1 IV 1952)

В ряде работ нашей лаборатории ([1]) было показано, что путем ферментативного ресинтеза белков из продуктов глубокого расщепления можно получить искусственные продукты глобулярной структуры с такими же молекулярными весами, как у белков. Подобные синтетические белки проявляют ряд биологических функций (антигенная, ферментативная, гормональная), присущие нативным белкам ([2]). Исследование ресинтезированных белков в ультрацентрифуге показало их значительную, хотя и неидеальную гомогенность ([3]).

Весьма важно было установить, получаем ли мы белок при ресинтезе в нативном или денатурированном состоянии. Напомним здесь, что наш опыт ставится таким образом, что вначале исходный нативный белок глубоко денатурируется при 100°, затем расщепляется смесью кристаллических ферментов — трипсина и химотрипсина, после чего подвергается ресинтезу под давлением 37°. Важнейшим критерием нативности белка является растворимость вблизи изоэлектрической точки; денатурированный белок в этих условиях нерастворим.

Измерение растворимости ресинтезированных белков показывает, что они являются продуктами, близкими к нативным, а не денатурированным белкам. Это обстоятельство дало нам надежду получить ресинтезированный белок в кристаллическом состоянии. Опыт по кристаллизации белка после ресинтеза удался полностью. Он является столь демонстративным и может быть так легко повторен в многочисленных лабораториях, что мы опишем его возможно детальнее.

Чтобы откристаллизовать ресинтезированный белок, необходимо приготовить заметное количество его.

Мы исходили из 1% раствора белка (чистого, кристаллического сывороточного альбумина лошади) в боратном буфере, pH 9,15, ионной силы 0,1. Раствор белка подвергался денатурации путем 10-минутного кипячения, затем прибавлялись протеолитические ферменты — трипсин и химотрипсин. Обе протеазы были нами кристаллизованы, они сохраняются под насыщенным сульфатом аммония. Ферменты растворялись предварительно в малых количествах подкисленной воды при pH 5 и не подвергались диализу (чтобы не вызвать инактивации ([4])). Концентрации трипсина и химотрипсина в этих растворах определялись по поглощению ультрафиолетового света (при λ 2800 Å) с помощью спектрофотометра. Затем определенные небольшие объемы ферментных растворов добавлялись к субстрату с таким расчетом, чтобы концентрация трипсина составляла 0,002%, а химотрипсина 0,01%. Реакция протео-

лиза производилась в течение 4 час. при 37°. Глубина гидролиза определялась на приборе Ван-Слайка; она составляет в типичном эксперименте 19,3% (это означает, что из всего наличного количества пептидных связей 19,3% раскрылись в результате протеолиза).

Отсюда мы немедленно можем оценить средний размер осколка в гидролизате — он состоит из $\frac{1}{0{,}193} \sim 5$ аминокислотных остатков. Эта смесь, главным образом пентапептидов, служила нам исходным материалом для ресинтеза. Для каждого ресинтеза мы брали 50 мл гидролизата, т. е. 0,5 г в расчете на сухое вещество.

Как показали наши прежние опыты, кристаллические ферменты, в отличие от природных, инактивируются под давлением, но могут быть стабилизированы добавлением глюкозы. Поэтому перед тем, как поместить гидролизат под давление, к нему прибавлялась чистая глюкоза с таким расчетом, чтобы его концентрация по глюкозе составляла 20%. При этом pH раствора немного смещается в кислую сторону вследствие взаимодействия борной кислоты с глюкозой, однако для наших опытов это обстоятельство несущественно.

Затем гидролизат заливался в стеклянную ампулу с небольшим отверстием, емкостью в 50 мл; ампула завязывалась в резиновый мешочек, содержавший 5 мл раствора, идентичного с ее содержимым, и помещалась в канал бомбы высокого давления. В этих опытах ресинтезировалось сразу значительное количество белка, поэтому бомба бралась довольно больших размеров. Диаметр канала был 25 мм, глубина канала 190 мм (с нижней стороны он был глухим). Бомба заливалась дестиллированной водой, затем вкладывалась точеная резиновая пробка для уплотнения и стальной поршень. На поршень надавливали с помощью гидравлического пресса с общей силой в 30 т, что создавало внутри бомбы гидростатическое давление 6000 атм. Реакция ресинтеза длилась 20 час. при 37°. Затем давление снималось, ампула извлекалась из канала бомбы и раствор ресинтезированного белка подвергался анализу по Ван-Слайку.

Опыты давали глубину ресинтеза (т. е. процент вновь образовавшихся пептидных связей от того количества, которое распалось при протеолизе) 65—70%. Чтобы освободить от глюкозы основную массу ресинтезированного белка, производилось его осаждение сульфатом аммония. Для этого к раствору, извлеченному из ампулы, добавлялся сухой $(NH_4)_2SO_4$ приблизительно до 0,7 насыщения (условие полного осаждения). При этом обильно выпадали хлопья ресинтезированного белка. Заметим, между прочим, что, добавляя таким же образом сульфат аммония к гидролизату, можно наблюдать лишь образование легкой коллоидной мути. Осадок ресинтезированного белка отфильтровывался и отжимался на фильтре, затем он снова растворялся в минимуме (~ 2 мл) воды, в которой pH был доведен до 4,7—4,8 (по индикатору) с помощью 4% раствора уксусной кислоты.

Подобный концентрированный раствор ресинтезированного белка слегка мутен из-за присутствия небольшой примеси денатурированного белка. Поэтому он фильтровался, а затем к нему по каплям, при сильном помешивании, прибавлялся насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ до появления муарового, явно кристаллического мелкого осадка. Выпадение кристаллов ресинтезированного серумальбумина происходит чрезвычайно легко, как это свойственно очень чистым белковым растворам. Через 2—3 часа в растворе образуется масса хорошо выраженных кристалликов, вполне идентичных по виду с кристаллами природного сывороточного альбумина.

На рис. 1 (см. вклейку к стр. 936) изображены подобные кристаллы ресинтезированного белка при двух различных увеличениях (130 и 260).

Казалось бы, сам факт столь легкой кристаллизуемости ресинтези-

рованных белков свидетельствует об очень высокой степени их гомогенности. Однако для того, чтобы подойти к этому вопросу количественно, мы исследовали наш кристаллизованный ресинтезированный серумальбумин в ультрацентрифуге. Для этого кристаллы тщательно отжимались на фильтре, а затем растворялись в боратном буфере, pH 9,15, ионной силы 0,2. 1% по белку раствор ресинтезированного альбумина подвергался изучению в ультрацентрифуге.

На рис. 2 изображены экспериментальные картины седиментации, полученные для нативного (*Б*) и ресинтезированного (*А*) белка. Константы седиментации обоих белков практически совпадают. Так, у нативного белка $S = 4{,}45 \cdot 10^{-13}$ сек., у ресинтезированного кристаллического $S = 4{,}53 \cdot 10^{-13}$ сек. Однако в глаза бросается различие в ширине

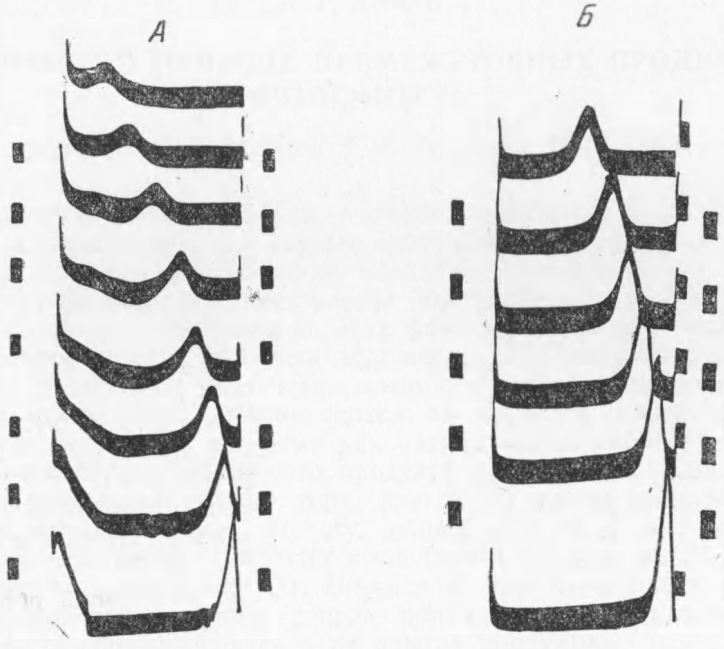

Рис. 2

седиментационных пиков (границ белкового раствора с растворителем). У нативного белка расширение пиков определяется диффузией, у кристаллического ресинтезированного белка расширение происходит также из-за неполной однородности макромолекул.

С помощью разработанного в нашей лаборатории метода можно оценить средний разброс молекулярных весов в ресинтезированном белке, сравнивая расширение пиков в седиментационной диаграмме ресинтезированного и нативного белков. Анализ экспериментальных кривых показывает, что разброс молекулярных весов ресинтезированного белка составляет $\pm 22\%$.

Следовательно, при ресинтезе под давлением образуются макромолекулы белка, не вполне одинаковые по макроструктуре. Может быть, поэтому и различные виды биологической активности, рассчитанные на единицу веса ресинтезированного белка, все же, как правило, ниже, чем на единицу веса природного белка.

Любопытно, что наличие некоторого разброса молекулярных весов не служит препятствием для кристаллизации ресинтезированного белка. Эта кристаллизация происходит исключительно легко и быстро.

Поступило
5 III 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] С. Е. Бреслер, ДАН, **55**, 145 (1947); С. Е. Бреслер и М. В. Гликина, Биохимия, **12**, 389 (1947); С. Е. Бреслер, Г. В. Самсонов и Н. А. Селезнева, Биохимия, **14**, 524 (1949). [2] С. Е. Бреслер, А. П. Коников и Н. А. Селезнева, ДАН, **65**, 521 (1949); С. Е. Бреслер, М. В. Гликина, А. П. Коников, Н. А. Селезнева и П. А. Финогенов, Изв. АН СССР, сер. физ., **13**, 392 (1949); С. Е. Бреслер, М. В. Гликина и А. М. Тонгур, ДАН, **78**, 543 (1951), [3] С. Е. Бреслер, М. В. Гликина, Н. А. Селезнева и П. А. Финогенов, Биохимия, **17**, 44 (1952). [4] С. Е. Бреслер и Н. А. Розенцвейг, Биохимия, **16**, 84 (1951).