

А. М. КУЗИН и В. И. МЕРЕНОВА

БИОСИНТЕЗ ГЛЮТАМИНА, УГЛЕВОДОВ И БЕЛКОВ, МЕЧЕННЫХ РАДИОАКТИВНЫМ УГЛЕРОДОМ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 IV 1952)

Для различных биохимических и физиологических исследований часто бывают нужны определенные оптические изомеры органических веществ, меченные изотопом. Получение их путем органического синтеза представляет большие трудности, поэтому более целесообразно использовать возможность биосинтеза этих соединений.

Для введения радиоактивного углерода во многих случаях можно использовать процесс фотосинтеза зеленым листом растения, так как при этом углерод поглощаемой растением меченой углекислоты легко входит в разнообразные вещества растения за счет реакций обмена.

Недостатком этого метода при выделении какого-либо одного вещества является незначительное использование радиоуглерода, распределяющегося сразу во многих соединениях.

Избежать этого недостатка возможно только путем одновременного выделения и использования ряда веществ, меченных углеродом, что значительно повысило бы эффективность использования взятого в опыт радиоуглерода и сделало бы этот метод практически ценным.

В настоящей работе и была поставлена задача разработать методику получения глютамина, меченого радиоуглеродом, с одновременным получением глюкозы, фруктозы, белков и пентозанов, меченных углеродом C^{14} .

Для фотосинтеза были взяты листья сахарной свеклы в количестве 100 г сырого веса. Фотосинтез осуществлялся в камере, изображенной на рис. 1.

Устройство камеры позволяло работать с большим количеством листьев и осуществить в процессе фотосинтеза подкормку листьев аммонийными солями. Черешки листьев во все время фотосинтеза погружены в воду. После загрузки камеры листьями и введения в стаканчик 110 мг углекислого бария с активностью в 200 μC в камере создавался небольшой вакуум через кран А. Затем кран А закрывался и через бюретку В вводилось 2 мл 80% молочной кислоты для выделения радиоактивного CO_2 , после чего камера освещалась с двух сторон лампами накаливания по 300 свечей каждая. Для охлаждения свет проходил через водный фильтр.

По прошествии 8 час. фотосинтеза подача света прекращена. В камеру, для повышения азотистого питания, через бюретку В введено 25 мл 0,25 М раствора азотнокислого аммония, и листья оставлены в темноте на 12 час.

На следующий день камера освещалась в течение 15 час., и после повторного 12-часового стояния в темноте опыт был закончен. Остаток

CO₂ извлечен из камеры путем быстрого последовательного эвакуирования и пополнения воздухом, не содержащим CO₂. Угольный ангидрид при этом поглощался раствором щелочи, из которого затем осаждался хлористым барием. Измерение активности углекислого бария давало возможность судить о радиоактивном CO₂, не вошедшем в синтез.

Листья фиксировались жидким воздухом, растирались с кварцевым песком, и полученная масса дважды экстрагировалась 50 мл. воды. Экстракт отжимался и осаждался основным уксуснокислым свинцом.

В полученном фильтрате растворяли 400 мг глутамина в качестве носителя, и глутамин осаждался азотнокислой ртутью. Полученный ртутный комплекс глутамина отделялся центрифугированием, тщательно промывался, суспензировался в дистиллированной воде и разлагался сероводородом. После удаления сернистой ртути и избытка сероводорода

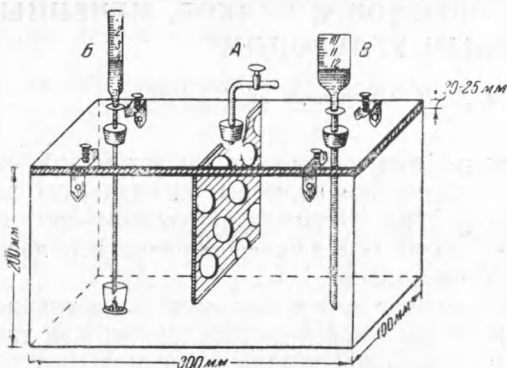


Рис. 1.

раствор глутамина сгущался в вакууме до небольшого объема. К полученному раствору добавляли несколько кристалликов глутамина и трехкратное количество теплого крепкого спирта.

При охлаждении глутамин выкристаллизовывался в виде мелкокристаллического осадка. Полученный глутамин трижды перекристаллизовывался из водно-спиртовой среды с применением активированного угля для обесцвечивания растворов.

Глутамин получен в виде прекрасно образованных кристаллов с т. пл. 183° и активностью в 10 000 имп/мин · мг. Выход 200 мг.

Осадок, полученный при осаждении основным уксуснокислым свинцом, разлагался сероводородом и соединялся с фильтратом, полученным после отделения ртутного комплекса глутамина и удаления из него ртути сероводородом.

Фильтрат гидролизовался 0,5 N H₂SO₄ (гидролиз сахарозы). Объединенный фильтрат, содержащий глюкозу и фруктозу, освобождался от солей пропусканием через анионит и катионит, сгущался в вакууме и после добавления 500 мг х. ч. глюкозы в качестве носителя глюкоза выделялась по методу, предложенному Путманом (1). Получено 500 мг кристаллической глюкозы с активностью 4 190 имп/мин · мг.

К маточному раствору после кристаллизации глюкозы добавляли 500 мг х. ч. фруктозы. Радиоактивная фруктоза выделялась путем переведения ее в фруктозат кальция, разложения его и последующей кристаллизации согласно методу Путмана. Было получено 400 мг кристаллической фруктозы с активностью 500 имп/мин · мг.

Из листовой стромы растительные белки трехкратно извлекались 1% раствором едкого натра. Из полученных растворов белки осаждались трихлоруксусной кислотой, тщательно промывались 4% трихлоруксусной кислотой и вновь растворялись в 1% растворе едкого натра.

Процедура очистки путем растворения в щелочи и осаждения трихлоруксусной кислотой повторялась трижды. Полученный белок частично растворялся в 60% этиловом спирте и из раствора осаждался эфиром.

Спирторастворимого белка получено 80 мг с активностью 3 000 имп/мин · мг, спиртонерастворимого белка получено 300 мг с активностью 2 400 имп/мин · мг.

Из кислого фильтрата, полученного после осаждения белков трихлоруксусной кислотой, после его сгущения в вакууме были выделены путем

осаждения смесью спирта с эфиром полисахариды, дававшие реакцию на уроновые кислоты и пентозы. Этой полисахаридной фракции, гемицеллюлозы, было выделено 180 мг с активностью 2700 имп/мин · мг.

Лаборатория биофизики, изотопов и излучений
при отделении биологических наук
Академии наук СССР

Поступило
15 II 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ E. Putman, W. Hassid, G. Kratkoff and H. Barker, J. Biol. Chem. 173, 2 (1948).