

Г. А. ДЕБОРИН и Г. Б. ГОРБАЧЕВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПЛЕНОК ФЕРМЕНТОВ, ПОГЛОТИВШИХ ГИДРОФОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА

(Представлено академиком А. И. Опариным 7 VI 1952)

Ранее (1) мы исследовали поверхностные пленки белков, поглотивших гидрофобные вещества. Было изучено поведение яичного альбумина и сывороточного альбумина лошади, в молекулы которых вводился гидрофобный краситель судан III, и было показано, что в мономолекулярном слое на поверхности сернокислого аммония эти белки занимают удвоенную площадь и обладают удвоенным молекулярным весом. Это дало нам основание полагать, что введение в молекулу глобулярного белка гидрофобного вещества приводит к образованию в поверхностном слое ассоциатов белка, состоящего из двух молекул, т. е. из двойников. Образование двойников в этих условиях находится в полном согласии с представлениями С. Е. Бреслера и Д. Л. Талмуда (2) и П. В. Афанасьева и Д. Л. Талмуда (3) о природе глобулярных белков и об их превращениях под влиянием внешней среды.

Весьма интересным является выяснение вопроса о том, способны ли ферменты образовывать ассоциаты в поверхностном слое при поглощении гидрофобных веществ.

За последнее время был опубликован ряд работ, в которых было доказано образование двойников ферментов. Так, Шверт (5) с помощью ультрацентрифуги исследовал α - и γ -химотрипсин и химотрипсиноген. Он показал, что α -химотрипсин и γ -химотрипсин в растворах ведут себя как обратимые мономер — димер равновесные системы. Степень ассоциации увеличивается с увеличением концентрации фермента и уменьшается с увеличением рН. Для димера α -химотрипсина он получил молекулярный вес 35 000, а для мономера 17 500. Для химотрипсиногена явление димеризации им не обнаружено. Согласно данным Шверта, активной формой ферментов являются мономеры, так как область устойчивости мономеров фермента совпадает с областью рН, оптимальной для действия фермента. Это согласуется с представлениями П. В. Афанасьева (4), по которым активный комплекс является димером фермента, образующимся за счет сродства субстрата к ферменту. Эта работа Шверта была недавно подтверждена Смитом с сотр. (6).

Буллоном (7) были изучены поверхностные пленки некоторых ферментов. Он показал, что пепсин образует на поверхности 5% сернокислого аммония ассоциаты, причем степень ассоциации является функцией начальной поверхностной концентрации белка. Им было также изучено поведение в монослоях пленок химотрипсина и химотрипсиногена. Оба белка дают на 5% сульфате аммония хорошо образованные пленки, образующие ассоциаты при высокой начальной поверхностной концентрации белка.

Более подробно образование ассоциатов ферментов в поверхностном слое исследовано в работе Мишука и Эйриха (8). Они показали, что при растекании на 35% сернистым аммоний трипсин и ингибитор трипсина из соевых бобов образуют, соответственно, димеры с удвоенным молекулярным весом. При нанесении на поверхность эквимолекулярных количеств трипсина и ингибитора образуется ассоциат, состоящий из димера трипсина и димера ингибитора. Эта реакция протекает независимо от последовательности введения компонентов в реакцию.

В свете имеющихся данных о поведении молекул ферментов в монослоях нам представлялось весьма интересным исследовать поглощение

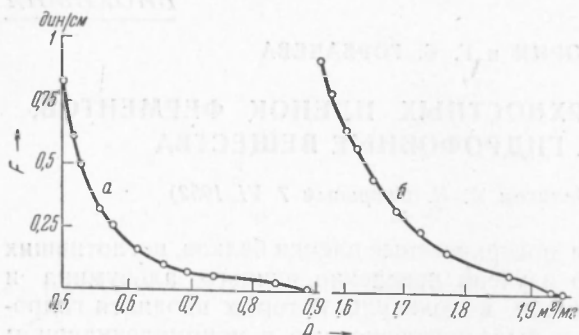


Рис. 1

10 см³ раствора фермента (концентрации обоих ферментов были равны 0,6%) со 100 мг красителя в течение 10—15 мин. После отфильтровывания избытка красителя фермент в обоих случаях разбавлялся до концентрации около 0,03%, применявшейся для работы.

Измерение поверхностного давления проводилось по методу Вильгельми. В качестве подкладки применялся 5% раствор сернистого аммония (при рН 5,7 для химотрипсина и рН 7,9 для трипсина).

В области давлений, не превышающих 0,75—1 дин/см, кривые зависимости поверхностного давления от площади, занимаемой молекулами фермента в монослое, обладали хорошей обратимостью и воспроизводимостью.

Отдельным контрольным опытом было установлено, что при нанесении на поверхность сернистого аммония раствора красителя судан III не возникает поверхностного давления, т. е. что краситель не образует мономолекулярного слоя.

На рис. 1 приведены кривые зависимости поверхностного давления F от площади A фермента в монослое для трипсина. Кривая a соответствует трипсину, не поглотившему краситель, а кривая b — трипсину, поглотившему судан III. Из рассмотрения этих кривых видно, что введение гидрофобного красителя смещает кривую, характерную для чистого трипсина, в сторону больших площадей и приводит к возрастанию площади, занимаемой молекулами трипсина в монослое, примерно вдвое.

На рис. 2 приведены рассчитанные по экспериментальным данным графики зависимости произведения FA от F для того же фермента, позволяющие рассчитать молекулярный вес фермента в монослое. Расчеты показали, что молекулярный вес трипсина в поверхностном слое при поверхностной концентрации 0,43 мг/м² равен около 98 000. Это означает, что трипсин образует в монослое двойники, что подтверждается также данными Мишука и Эйриха (8). Молекулярный вес трипсина, поглотившего судан III, при этой же поверхностной концентрации также равен 98 000.

Предельная площадь, занимаемая «газовой» пленкой трипсина, поглотившего судан III, равна 1,62 м²/мг, а чистого трипсина 0,46 м²/мг.

гидрофобных веществ молекулами ферментных белков и их поведение в поверхностном слое.

Для опытов брались свежеприготовленные, высокоактивные препараты двух ферментов: трипсина и химотрипсина. В качестве гидрофобного вещества применялся краситель судан III. Введение красителя осуществлялось тщательным перемешиванием

Из этих данных видно, что в результате поглощения красителя предельная площадь «газовой» мономолекулярной пленки трипсина заметно возрастает. Это дает основание полагать, что поглощение гидрофобных веществ трипсином приводит к существенным изменениям конфигурации его молекул в поверхностном слое, не сопровождаемым, однако, дальнейшей ассоциацией димеров.

Иная картина наблюдается при внесении в монослой химотрипсина. В зависимости от исходной поверхностной концентрации химотрипсин образует в монослое ассоциаты — димеры и тетрамеры. Образование этих ассоциатов подтверждается возрастанием молекулярного веса частиц с возрастанием поверхностной концентрации фермента. Эти данные приведены в табл. 1.

Характерное отличие в поведении монослоев химотрипсина от трипсина состоит в том, что образование ассоциатов сопровождается у химотрипсина уменьшением предельной площади пленки. Это указывает, как нам представляется, на то, что характер изменений конфигурации молекул химотрипсина при ассоциации в поверхностном слое существенно отличается от тех изменений, которые при том же процессе претерпевают в поверхностном слое молекулы трипсина.

Таблица 1

Исходная поверхностная концентрация химотрипсина в $\text{мг}/\text{м}^2$	Приблизит. мол. вес частиц (по экспер. данным)	Пред. площадь в $\text{м}^2/\text{мг}$
0,135	40 000	1,5
0,270	80 000	1,0
0,540	160 000	0,86

Исходная поверхностная концентрация фермента составляла в обоих случаях $0,270 \text{ мг}/\text{м}^2$. Расчет молекулярного веса в монослое, проведенный по этим кривым, дает для химотрипсина без красителя значение 80 000 и для химотрипсина, поглотившего судан III, 160 000. Отсюда мы делаем вывод, что в результате введения гидрофобного красителя димеры химотрипсина в поверхностном слое переходят в тетрамеры. При этом предельная площадь химотрипсина в пленке падает от значения $1,0 \text{ м}^2/\text{мг}$ для фермента без красителя до $0,74 \text{ м}^2/\text{мг}$ для фермента, поглотившего краситель.

При исходной поверхностной концентрации химотрипсина в монослое, равной $0,540 \text{ мг}/\text{м}^2$, он образует ассоциаты с молекулярным весом

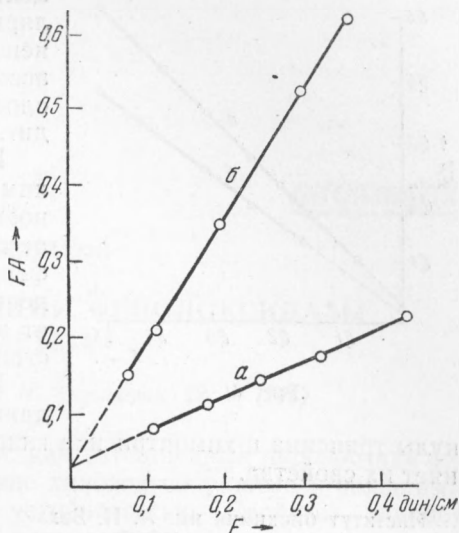


Рис. 2

нам представляется, на то, что характер изменений конфигурации молекул химотрипсина при ассоциации в поверхностном слое существенно отличается от тех изменений, которые при том же процессе претерпевают в поверхностном слое молекулы трипсина.

На рис. 3 приведены кривые зависимости поверхностного давления F от площади, занимаемой молекулами химотрипсина в монослое A . Кривая a соответствует ферменту, не поглотившему краситель, а кривая b — ферменту, поглотившему краситель судан III.

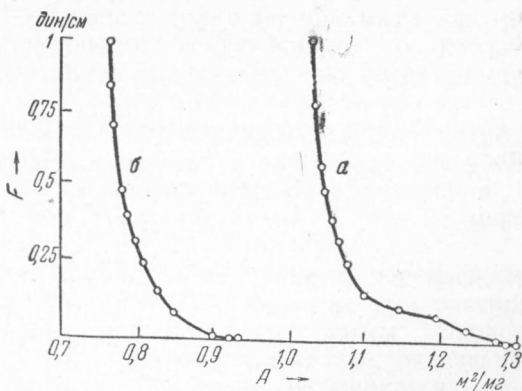


Рис. 3

около 160 000. При введении гидрофобного красителя и нанесении на поверхность сульфата аммония пленки фермента с исходной кон-

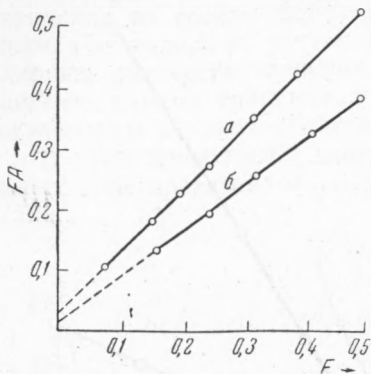


Рис. 4

центрацией, равной 0,540 мг/м², молекулярный вес фермента в пленке остается неизменным. Повидимому, дальнейшей ассоциации химотрипсина в поверхностном слое при этих условиях уже не происходит.

Из приведенных данных видно, что химотрипсин при увеличении его поверхностной концентрации в слое образует ассоциаты, но не превышающие 4 молекул фермента в одной частице ассоциата. Введение гидрофобного красителя содействует этому процессу, смещая равновесие в сторону образования ассоциатов.

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что введение в молекулы трипсина и химотрипсина гидрофобного вещества существенно изменяет их свойства.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
23 V 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. А. Деборин и Л. Б. Горбачева, ДАН, 82, 943 (1952). ² Р. Е. Бреслер и Д. Л. Талмуд, ДАН, 43, 326, 367 (1944). ³ П. В. Афанасьев, Изв. АН СССР, сер. биол., № 1, 115 (1952). ⁴ П. В. Афанасьев, Биохимия, 14, 259 (1949); Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 253 (1949). ⁵ G. Schwert, J. Biol. Chem., 179, 655 (1949). ⁶ E. L. Smith, D. M. Brown and M. Laskowsky, *ibid.*, 191, 539 (1952). ⁷ H. B. Vull, *ibid.*, 185, 27 (1950). ⁸ E. Mishuck and F. Eirich, J. Polymer Sci., 7, 341 (1951).