

В. Я. БРОДСКИЙ и И. М. ЛИМАРЕНКО

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИРОЗИНА И ТРИПТОФАНА В РАСТВОРАХ БЕЛКОВ И НА СРЕЗАХ ТКАНИ ПО ИЗМЕНЕННЫМ СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧАХ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 27 I 1954)

Многие органические вещества обладают способностью поглощать ультрафиолетовые лучи. Однако до последнего времени ультрафиолетовая микроскопия занималась, главным образом, определением нуклеиновых кислот, оставляя без внимания другие вещества биологического происхождения. Дело в том, что вещества, поглощающие ультрафиолетовые лучи с длиной волны 250—290 м μ , — нуклеиновые кислоты, нуклеотиды и ароматические аминокислоты, имеют близкие максимумы поглощения и, кроме того, нуклеотиды поглощают в этой области спектра в десять раз сильнее, чем ароматические аминокислоты.

На срезах ткани задачу микроскопического разделения нуклеиновых кислот и ароматических аминокислот, поглощающих в той же области спектра, можно решить двумя путями: 1) удалить ферментативно или при помощи гидролиза нуклеиновые кислоты, после чего из веществ, поглощающих лучи 250—290 м μ , остаются только ароматические аминокислоты. Этот метод дает возможность определить ароматические аминокислоты в сумме, но не позволяет судить о наличии той или иной кислоты в отдельности (1); 2) химически изменить молекулу поглощающего вещества, что может изменить и спектр поглощения этого вещества: сместить максимум поглощения, способствовать появлению новых максимумов, увеличению поглощения и т. д. Впервые этот метод исследования обоснован и применен в работах Е. М. Брумберга и других советских авторов (2, 3).

В настоящей работе для разделения ароматических аминокислот используется реакция с азотистой кислотой. Реакция с HNO_2 неспецифична для ароматических аминокислот, но в мягких условиях эта реакция может привести, кроме дезаминирования, к нитрированию бензольного кольца этих аминокислот, конденсации колец или иным изменениям молекулы, которые должны сказаться и на поглощении веществ.

Первая часть работы проведена с чистыми растворами аминокислот. Спектрофотометрически исследовалось поглощение ряда аминокислот: аргинина, гистидина, цистеина, метионина, валина, аланина, глутаминовой кислоты, лейцина, лизина, триптофана, тирозина и фенилаланина. Измерялось собственное поглощение аминокислот (щелочной раствор) и после реакции с 0,2 HNO_2 (NaNO_2 подкислялся уксусной кислотой). Концентрация аминокислот во всех опытах была 0,01%. Растворы триптофана и тирозина разводились дополнительно. Для исключения поглощения ультрафиолетовых лучей азотистой кислотой измерение производилось путем сравнения опытного раствора (аминокислота + HNO_2) с раствором HNO_2 той же концентрации. Все растворы выдерживались 1½ часа при температуре 40°.

При работе на кварцевом фотоэлектрическом спектрофотометре выяснилось, что в результате действия HNO_2 изменяются спектры поглощения только ароматических аминокислот: тирозина, триптофана и фенилаланина. Исследование собственного поглощения (щелочной раствор) этих аминокислот показывает, что триптофан имеет максимум поглощения около 280 м μ , тирозин 290 м μ , а фенилаланин 250 м μ , причем около 300 м μ кривые поглощения этих аминокислот приближаются к нулю и более не поднимаются. При действии HNO_2 у триптофана появляется второй значительный максимум поглощения в зоне 310 м μ , а первый смещается к 270 м μ . Вторым максимумом поглощения тирозина обнаруживается на 390 м μ , первый четко определяется на 265 м μ . Спектр поглощения фенилаланина меняется незначительно: появляется очень небольшой и не всегда четко обнаруживаемый максимум 350 м μ . Таким образом, уже эти наблюдения показывают возможность раз-

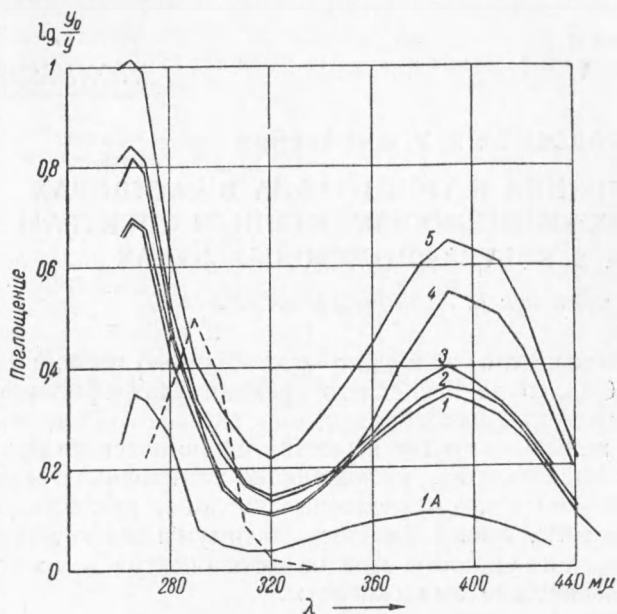


Рис. 1. Тирозин 0,0005 М. 1 — HNO_2 0,2%, 40°, 10 час.; 1А — то же, 30 мин.; 2 — HNO_2 1%, 40°, 10 мин.; 3 — то же, 1 час; 4 — HNO_2 1%, 50°, 30 мин.; 5 — то же, 1 час; 6 — щелочной 0,0005 М раствор тирозина

дельного спектрофотометрического определения триптофана и тирозина в растворах аминокислот по характерным кривым их поглощения.

Однако для целей ультрафиолетовой микроскопии, где о поглощении судят не по спектрограммам, а по фотоснимкам, снятым в разных длинах волн, такие опыты были бы недостаточны. В ткани концентрация тирозина нередко в несколько раз выше концентрации триптофана, возможны и обратные случаи. Таким образом, тирозин, хотя и на спаде кривой поглощения, но при высокой концентрации может дать картину поглощения на 300 м μ и в отсутствие триптофана. Те же рассуждения могут иметь место и в отношении триптофана. Чтобы избежать такой ошибки, необходимо было подобрать условия опыта, когда при 310 м μ поглощение тирозина было бы близко к нулю, а в длинном ультрафиолете было бы незначительным поглощение триптофана. Опыты, поставленные с целью определить влияние времени реакции, температуры и концентрации HNO_2 на изменение спектра поглощения ароматических аминокислот, показали следующее:

1. Тирозин. При небольшой концентрации HNO_2 (0,2%) при температуре 40° второй максимум поглощения тирозина (390 м μ) обнаруживается при 5-минутной реакции, но до 1 часа поглощение невелико. При использовании больших концентраций HNO_2 (1%) поглощение ультрафиолетовых лучей тирозином значительно на обоих максимумах уже при 10-минутной реакции. Со временем поглощение увеличивается. Особенно велико поглощение при 50°, причем при этой температуре наибольшее поглощение отмечается при длительности реакции в 2 часа. Измененные в результате реакции с HNO_2 кривые поглощения тирозина имеют два

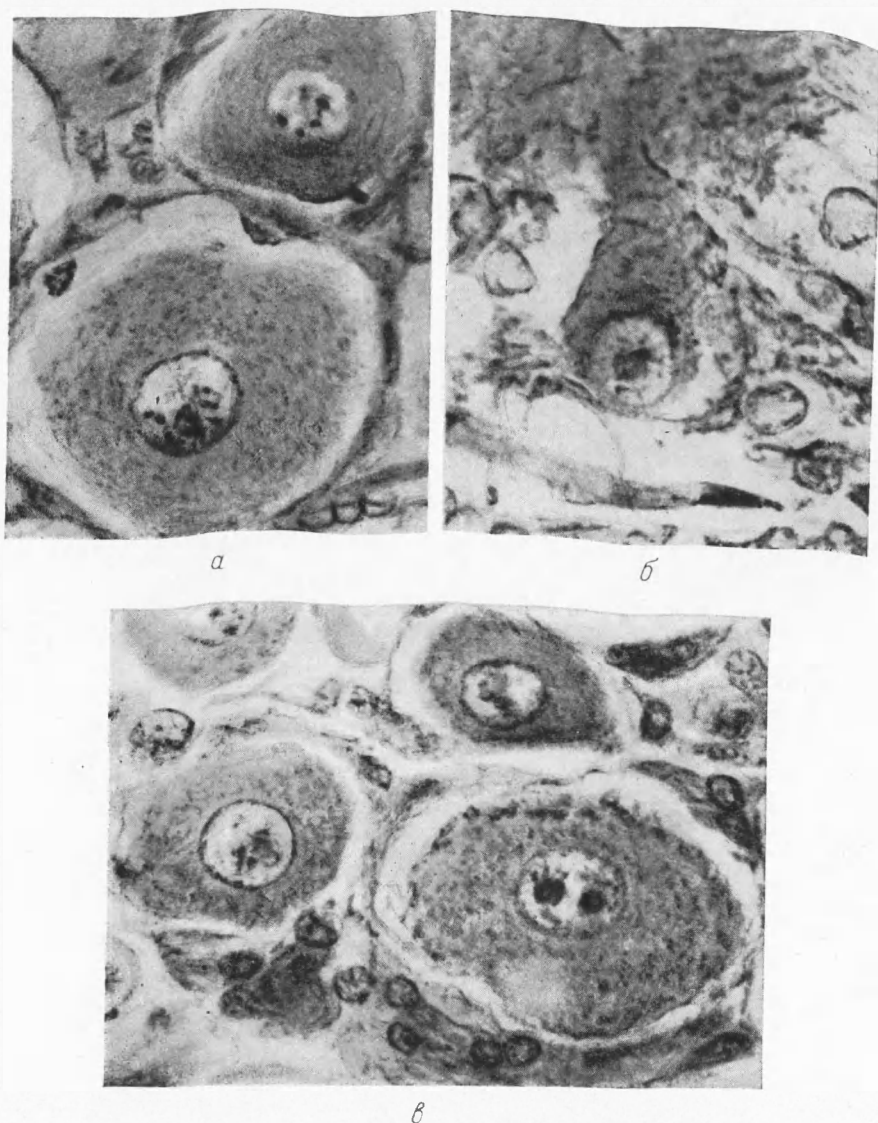


Рис. 4. Тирозин и триптофан в нервных клетках. Реакция с 1% HNO_2 . Микрофото со светофильтрами, выделяющими лучи 405 м μ (а) и 313 м μ (б, в). $\times 750$. а — тирозин в нервных клетках из спинального ганглия; наиболее интенсивно поглощают лучи длиной волны 405 м μ глыбки вокруг ядрышка; б — триптофан в клетке Пуркинье и клетках-зернах из мозжечка, сильно поглощают тигроид и глыбки в ядре; в — триптофан в клетках из спинального ганглия; триптофан в тигроиде и в глыбках ядер нейронов и сателлитов; в месте отхождения аксона поглощение слабое

максимума: 265 и 390 м μ и спад поглощения в области 300—320 м μ , причем поглощение увеличивается пропорционально времени реакции, температуре и концентрации реагента (см. рис. 1).

2. Триптофан. Максимум поглощения 310 м μ значителен уже при непродолжительной обработке (10 мин.) раствора аминокислоты 0,2% HNO_2 . С увеличением времени реакции растет и поглощение. При

длительности реакции более 4 час. минимум поглощения 290 м μ исчезает, а второй максимум смещается к 300 м μ , что позволяет предполагать дальнейшее изменение молекулы триптофана. При использовании 1% HNO_2 и времени реакции до 10 мин. кривая поглощения триптофана имеет такой же вид, как в случае 0,2% HNO_2 (10 мин.—4 часа). При длительности реакции 10—30 мин. второй максимум смещается к 300 м μ и по величине поглощения становится равным первому максимуму (270 м μ). В случае 1- и 2-часовой реакции остается только один максимум 300 м μ . Такие же изменения кривой поглощения, но за меньшее время реакции, происходят при повышении температуры до 50°.

Во всех случаях наблюдается резкое снижение поглощения, начиная с 320 м μ , причем около 400 м μ кривая приближается к нулю (см. рис. 2).

3. Фенилаланин. Как отмечалось выше, поглощение фенилаланина изменяется незначительно. В любых условиях опыта поглощение фенилаланина в зоне 300—310 м μ менее поглощения триптофана в 30—50 раз и слабее поглощения тирозина в области 390—410 м μ более чем в 50 раз.

В опытах, выясняющих влияние условий реакций на спектр поглощения, использовались 0,01% растворы аминокислот. Перед измерением поглощения растворы ароматических аминокислот разводились в 4 раза. Чувствительность реакции значительно выше—0,05—0,08 γ /мл. Затем исследовалось изменение поглощения белков, содержащих ароматические аминокислоты при реакции с HNO_2 . Измерялось поглощение желатины (отсутствует тирозин и триптофан), гистона (содержится тирозин, отсутствует триптофан) и казеина (содержится триптофан и тирозин). При реакции с HNO_2 кривая поглощения желатины в основном не меняется. Кривая поглощения гистона дает большой второй максимум поглощения 400 м μ , показывающий наличие тирозина (см. рис. 3). В кривой поглощения казеина четко намечаются два максимума 290 м μ (триптофан) и 400 м μ (тирозин). Смещение максимумов поглощения тирозина и триптофана, вероятно, объясняется связью с белком, подобно смещению максимума поглощения нуклеиновых кислот в нуклеопротеиде (4).

Опыты с растворами аминокислот и белков позволяют предполагать, что в мягких условиях реакции с HNO_2 гистологический препарат может

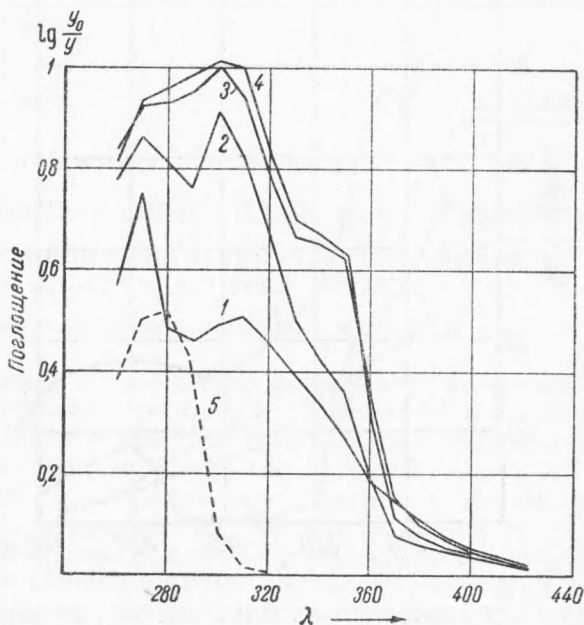


Рис. 2. Триптофан 0,0005 М. 1 — HNO_2 0,2%, 40°, 30 мин.; 2 — HNO_2 1%, 40°, 30 мин.; 3 — то же, 1 час; 4 — то же, 2 часа; 5 — щелочной 0,0005 М раствор триптофана

дать картину распределения триптофана и тирозина в ткани. При фотосъемке такого препарата с фильтром, выделяющим 313 м μ , когда поглощение триптофана превышает поглощение тирозина в 5—10 раз, обнаруживается триптофан

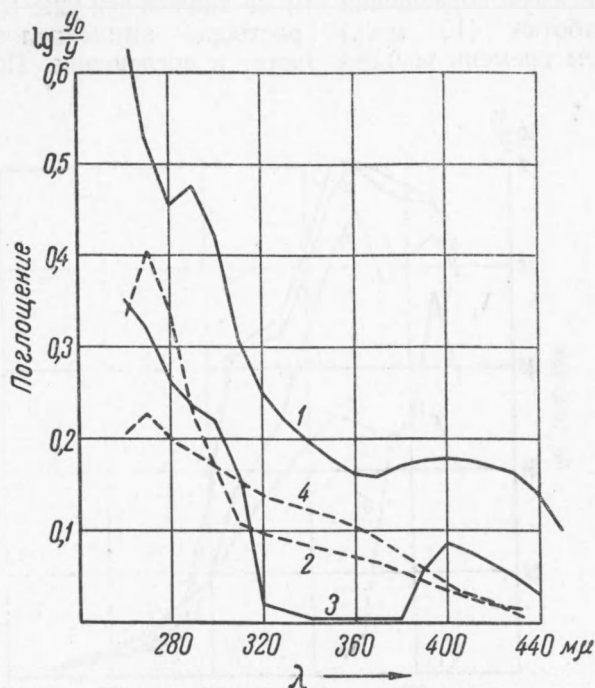


Рис. 3. 1 — казеин 0,05%, HNO_2 1%, 50° , 2 часа; 2 — казеин 0,05% раствор в 0,05 N HCl; 3 — гистон 0,02%, HNO_2 1%, 50° , 2 часа; 4 — гистон 0,02% раствор в 0,05 N HCl

(0,2—1% HNO_2 , 30 мин., 40°). Об отсутствии поглощения тирозина на этом снимке свидетельствует контрольная съемка с фильтром 436 м μ , где поглощение тирозина всегда выше, чем в зоне 313 м μ , а поглощение триптофана близко к нулю. Если при съемке с фильтром, выделяющим 436 м μ , ткань не поглощает, а на 313 м μ наблюдается достаточно четкое поглощение, можно утверждать, что поглощение в зоне 313 м μ обусловлено триптофаном. При более высокой температуре и большем времени реакции полнее реагирует тирозин (дополнительно 30 мин.—2 часа, 1% HNO_2 , 50°). Снимок с фильтрами, выделяющими 390—410 м μ , где поглощение тирозина превышает поглощение триптофана

более чем в 20 раз, дает представление о гистотопографии тирозина.

Микрофотографии (см. рис. 4 а, б, в) иллюстрируют распределение тирозина и триптофана в нервных клетках кролика. В цитоплазме особенно интенсивную реакцию на обе аминокислоты дает тигроид. Местоотхождения аксона почти не содержит тирозина и триптофана, в то время как оболочки отростков нейронов весьма ими богаты. Четкую положительную реакцию на тирозин и триптофан дают глыбки хроматина ядра, особенно хроматин, примыкающий к ядрышку. Ядрышки нейронов содержат небольшие количества ароматических аминокислот.

В заключение приносим глубокую искреннюю благодарность профессорам Е. М. Брумбергу и А. Н. Белозерскому за ценные советы и помощь в работе.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
16 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Caspersson, Cell Growth and Cell Function, 1950. ² Е. М. Брумберг, М. П. Бухман, В. Е. Козлов, ДАН, 86, 625 (1952). ³ Е. М. Брумберг, Вестн. АН СССР, 6, № 8—9, 117 (1946). ⁴ С. Е. Манойлов, Б. А. Орлов, О. Н. Сеткина, Биохимия, 13, 4, 337 (1948).