

А. С. КАЙНОВА, Б. Н. СТЕПАНЕНКО и А. Н. ПЕТРОВА
ПОЛУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОГЕНОВ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 28 I 1954)

Возможность получения полисахаридов типа гликогена путем ферментативного синтеза *in vitro* при помощи ферментов животных организмов была показана Кори (¹), который пользовался для этого ферментами различного происхождения — фосфорилазой мышц и экстрактом печеночной ткани, содержащими «ветвящий» фермент.

В Лаборатории физиологической химии АН СССР один из нас (²) показал возможность синтеза *in vitro* гликогеноподобных полисахаридов при помощи ферментов одинакового происхождения — мышечной фосфорилазы и выделенного из мышц «ветвящего» фактора — фермента ИА (изомеразы амилозы). В обоих случаях, однако, синтетические полисахариды были получены в весьма небольших количествах и могли быть охарактеризованы лишь по некоторым признакам: иодной реакции (^{1, 2}) и расщепляемости β -амилазой (²). Изучение строения синтетических полисахаридов типа гликогена (в отличие от синтетических полисахаридов типа амилоз) никогда не производилось. В то же время детальное изучение строения синтетических гликогеноподобных полисахаридов, установление их сходства или различий по сравнению с природными представляет весьма важную задачу, в частности, для проверки и оценки наших современных представлений о биосинтезе гликогена. Указанная работа, однако, возможна лишь после разработки удовлетворительного препаративного метода получения синтетических гликогеноподобных полисахаридов, дающего возможность получать их в количествах, достаточных для детального исследования. Разработка препаративного метода получения синтетических гликогенов и составляла цель настоящего исследования.

Для синтеза гликогенов мы воспользовались получением их из 1-фосфата глюкозы при помощи мышечных ферментов — фосфорилазы и фермента ИА в присутствии в качестве «затравки» небольших количеств гликогена и каталитически действующего цистеина.

Исходные вещества и ферментные препараты. Кристаллический 1-фосфат глюкозы мы получали по (³) с небольшими изменениями. Полученный препарат, судя по анализу, имел формулу $C_6H_{11}O_5PO_3K_2 \cdot 2H_2O$. Гликоген, необходимый в качестве «затравки», выделялся нами из мышц и печени по (⁴); после повторных переосаждений он не содержал золы и фосфора, содержал 0,03% N. Цистеин солянокислый применялся продажный, кондиционный. Фосфорилазу мы получали из мышц кролика по (⁵) с небольшими изменениями. Применяемый нами для синтеза препарат фосфорилазы представлял собой суспензию в дистиллированной воде кристаллов $(NH_4)MgPO_4$ с адсорбированной на них фосфорилазой. Количество воды, применявшейся для приготовления суспензии, обычно было равно 0,02 веса мышц, взятых для получения данных кристаллов $(MgNH_4PO_4$ -фосфорилаза). Отсутствие α -амилазы проверялось в каждом препарате фосфори-

лазы путем инкубирования его с 1% раствором крахмала в течение 7—10 дней. Активность фосфорилазы определялась по отщеплению остатков фосфорной кислоты от 1-фосфата глюкозы при стандартных условиях и выражалась в процентном отношении отщепившегося фосфата к исходному «органическому» фосфату. (Максимальная активность фосфорилазы при установлении равновесия синтез $\rightleftharpoons$ фосфоролиз может быть равна 70%.)

Фермент ИА мы получали из мышц кролика по (2). Ферментный препарат, применяемый для синтеза, представлял собой раствор фермента ИА в буферном растворе (NaHCO_3 , Na_2CO_3 , KCl), взятом в количестве 0,1 от веса взятых для выделения фермента мышц. Проверка отсутствия в препарате ИА α -амилазы и активность ИА проверялись одновременно путем инкубации с 1% раствором крахмала (в течение 7—10 дней) по изменению иодной реакции отбираемых проб. Изменение синей окраски с иодом в сине-зеленую уже на 1—2-й день инкубации было признаком очень хорошей активности ИА (что обозначалось $\times\times\times$). При использовании ступенчатого фотометра уже через 4 часа действие препаратов такой активности ($\times\times\times$) можно наблюдать в виде смещения абсорбционного максимума пробы с иодом с 610 к 570 м μ и изменения экстинкции в точке максимума с 0,70—0,75 до 0,40—0,48. Изменение синей окраски с иодом на красно-бурую (на 1—2-й день) свидетельствовало о хорошей активности ИА ($\times\times$).

Контроль за ходом синтеза качественно осуществлялся: 1) путем наблюдения за изменением окраски проб инкубационной жидкости с иодом; 2) по растворимости образующегося полисахарида (в случае синтеза амилозоподобных полисахаридов происходило выпадение их из раствора). Количественное наблюдение за ходом синтеза велось: 1) по нарастанию неорганического фосфата в инкубационной смеси, 2) путем определения количества полисахарида, анализируемого в виде глюкозы, образовавшейся после кислотного гидролиза диализованной инкубационной смеси (с учетом затравки).

В процессе работы необходимо было разрешить ряд вопросов, не освещенных или недостаточно освещенных в работах (1, 2), т. е. найти: 1) оптимальную концентрацию исходного вещества — 1-фосфата глюкозы; 2) оптимальные условия в отношении pH, среды и температуры; 3) оптимальное количество применяемого в качестве затравки гликогена; 4) оптимальное соотношение активностей ферментов фосфорилазы и ИА и количеств их препаратов. Оптимальной концентрацией 1-фосфата глюкозы оказалась концентрация 0,016 М, что подтвердило данные (1). Большие концентрации 1-фосфата глюкозы тормозят реакцию. Оптимальным pH среды оказался 6,9—7,0; оптимальной температурой 25°.

При выяснении оптимального количества применяемого в качестве затравки гликогена мы стремились воспользоваться минимальными затравками, обеспечивающими достаточно интенсивный синтез. Стремление к минимальным затравкам было вызвано желанием получить гликоген, по возможности мало «разбавленный» затравкой. Изучались затравки 0,1; 0,5 и 1,0 мг/мл инкубационной смеси (0,01; 0,05 и 0,1%). Оказалось, однако, что при 0,01 и 0,05% затравки при различных изменяемых нами активностях и количествах препаратов ферментов в инкубационной смеси образуются полисахариды типа амилопектина и амилозы (окрашивающиеся иодом в синий и сине-фиолетовый цвет и выпадающие в осадок). Лишь при количестве затравок 0,1% при определенных соотношениях активностей ферментов происходило образование значительных количеств полисахаридов типа гликогена, дающих красно-бурое или желто-бурое окрашивание с иодом.

Опыты по выяснению оптимальных активностей ферментов частично сведены в табл. 1 (время инкубации во всех опытах 16 час., содержание цистеина солянокислого 0,03 М).

Влияние активностей ферментов на характер синтезирующих полисахаридов

№ опыта	Объем инкубационной смеси в мл	Затравка в мг	Фосфорилаза		Изомеразы амилозы		Синтез в %	Окраска с иодом синтезированных полисахаридов	
			активность в %	объем препарата в мл	активность в %	объем препарата в мл		в осадке	в растворе
1	120	120	70	15	×××	45	70	Фиолетово-красная	Красно-бурая
2	80	80	70	10	×××	10	70	То же	То же
3	150	150	60	20	×××	20	60	Осадок нет	" "
4	80	80	50	10	×××	10	50	" "	" "
5	130	130	40	16	×××	16	40	" "	" "
6	80	80	50	50	××	10	50	Фиолетов.	" "
7	90	90	50	12	×	12	48	"	" "

Как видно из таблицы, результат синтеза в высокой степени зависит от соотношения активностей ферментов. В первых 5 опытах при постоянной очень высокой активности ИА (×××) мы пользовались фосфорилазой с постепенно понижающейся активностью (от 70 до 40%). Оказалось, что в опытах с высокой активностью фосфорилазы (70%) наряду с образованием гликогенподобных продуктов идет и образование полисахаридов типа амилопектина: фермент ИА как бы «не успевает» произвести в нужной степени изомеризацию длинных полисахаридных цепей, образуемых фосфорилазой. Наилучшие результаты наблюдаются в опытах 3, 4 и 5, когда при очень высокой активности ИА активность фосфорилазы равна 60—40%. При понижении активности фосфорилазы ниже 40% (при активности ИА (×××)) также образуются гликогенподобные продукты, но количество их меньше. Применение в опытах 6 и 7 фермента ИА меньшей активности (×× и ×) приводит опять к выпадению в осадок крахмалоподобных полисахаридов. Следовательно, оптимальным соотношением активностей ферментов является активность фосфорилазы 40—60% при максимальной активности фермента ИА (×××).

Таким образом, для успешного синтеза гликогена необходимы следующие условия: в 1 мл инкубационной смеси должно быть 1-фосфата глюкозы 6 мг (0,016 М); затравки гликогена 1 мг (0,1%); препарата фосфорилазы с активностью 40—60% 0,125 мл; препарата фермента ИА с активностью (×××) 0,125 мл; рН инкубационной смеси 6,9—7,0; температура 25°.

Пользуясь указанными условиями, мы разработали два варианта препаративного синтеза гликогенов.

І в а р и а н т. Несколько инкубационных смесей (от 2 до 5) объемом 40—140 мл ставятся параллельно при указанных выше соотношениях ингредиентов (постановка инкубационной смеси сразу в большом объеме приводила обычно к неудачам, аналогичным неудачам при перенесении лабораторных методов в условия более крупных масштабов). За ходом синтеза следили по окраске с иодом отбираемых проб, а также по нарастанию неорганического фосфата. После 10—16 час. инкубации окраска проб становилась интенсивной красно-бурой; после инкубации 16—32 часа — желто-бурой. В зависимости от желаемой окраски с иодом синтезированного гликогена, а также от степени синтеза (отщепления неорганического фосфата) синтез прерывался добавлением 50% трихлоруксусной кислоты до концентрации 5%. Осадок белка отделялся и раствор ставился на диализ против водопроводной, а затем дистиллированной воды на холоду в течение 2—3 суток. После диализа синтезированный полисахарид осаждался 2 объемами спирта, через 1—2 суток отделялся, про-

мывался спиртом и сухим эфиром и далее подвергался обычной очистке (6).

Приводим в качестве примера получение препарата № 1 (24 III 1952 г.). Приготовлено 5 инкубационных смесей. Смеси I и II содержали каждая: 480 мг 1-фосфата глюкозы; 160 мг цистеина; 80 мг гликогена; 10 мл фосфорилазы; 10 мл ИА; 60 мл воды. Смеси III и IV содержали каждая: 240 мг 1-фосфата глюкозы; 80 мг цистеина; 40 мг гликогена; 5 мл фосфорилазы; 5 мл ИА; 30 мл воды. pH 6,8; 7,0; $T = 25^{\circ}$; активность фосфорилазы 60%; активность ИА $\times\times\times$.

Через 16 час. синтез прошел на 60%, окраска проб иодом красно-фиолетовая; через 32 часа — синтез на 60%, окраска проб с иодом краснобурая. Фосфорилаза отделена, инкубационные смеси объединены, прибавлена трихлоруксусная кислота, и далее смесь обработана, как описано выше. После очистки получено 500 мг гликогена.

II вариант синтеза гликогенов заключается в постепенном «выращивании» затравки путем периодического добавления в инкубационную смесь 1-фосфата глюкозы и ферментов и периодического удаления «отработавших» ферментов и низкомолекулярных примесей. Синтез каждого гликогена состоит, таким образом, из нескольких циклов. Каждый цикл включает 2—3-кратное прибавление 1-фосфата, ферментов и цистеина до оптимальной, указанной выше, концентрации; когда прибавление этих компонентов не давало дальнейшего накопления гликогена в инкубационной смеси, производилось инаktivирование ферментов трихлоруксусной кислотой, их удаление и диализ против водопроводной и дистиллированной воды. После этого добавлением всех компонентов, необходимых для синтеза (кроме затравочного гликогена), начинался новый цикл. Контроль за ходом синтеза производился при помощи иодной реакции, а также анализа на содержание полисахаридов (после диализа и гидролиза пробы). При этом варианте мы получали 10—20-кратное количество гликогена по сравнению с исходным.

Так например, при синтезе гликогена № 4 инкубационная смесь 1-го цикла содержала: 420 мг 1-фосфата глюкозы; 210 мг цистеина; 70 мг гликогена; 9 мл фосфорилазы; 10 мл ИА; 51 мл воды при активности фосфорилазы 33%, активности ИА $\times\times\times$, pH 7,0 и $T = 25^{\circ}$. В результате 4 циклов (8-кратное прибавление ферментов, субстрата и цистеина и 4-кратный диализ) было получено 690 мг гликогена.

II вариант метода имеет очевидные преимущества перед I.

Лаборатория физиологической химии
Академии наук СССР

Поступило
27 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Т. Сори, С. Ф. Сори, J. Biol. Chem., 135, 733 (1940). ² А. Н. Петрова, Изучение процессов энзиматического распада и синтеза гликогена в мышцах, Докт. диссерт., М., 1950. ³ С. S. Hanes, Proc. Roy. Soc., 128 B, 421 (1939). ⁴ P. Ostern, S. Hübl, Acta biol. exp., 12, 89 (1939). ⁵ А. Н. Петрова, Е. Л. Розенфельд и др., ДАН, 66, 1141 (1949). ⁶ Б. Н. Степаненко, Е. М. Афанасьева, Биохимия, 12, 111 (1947).