Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 2

БИОХИМИЯ

Г. А. ДЕБОРИН, И. Е. ЭЛЬПИНЕР и О. М. ШИБАНОВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПЛЕНОК ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА, ПОДВЕРГНУТОГО ДЕЙСТВИЮ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН

(Представлено академиком А. И. Опариным 18 XI 1954)

Под влиянием ультразвуковых волн наступают денатурация и более глубокие изменения белковых молекул ([1], [2]). Изменения эти обнаружены преимущественно физическими и физико-химическими методами исследования. Так, спектрофотометрическое изучение озвученных водных растворов белка выявило снижение характерной для них специфической полосы поглощения (2800 Å). Наряду с этим наблюдалось повышение всей кривой поглощения в ультрафиолетовой области спектра ([3]). Однако эти данные не позволяют точно судить о характере и глубине тех изменений, которые возникают в белковой молекуле под действием ультразвука.

Более определенные данные получены полярографическим методом исследования. Известно, что в полярографическом отношении активны белки, содержащие сульфгидрильные или дисульфидные группы. Оказалось, что в фильтрате, полученном после осаждения озвученного белка трихлоруксусной кислотой, обнаруживается положительный полярографический эффект ([4]). Так называемый полярографический протеиновый эффект характерен и для аминокислот, в состав которых входят упомянутые группы. Предполагалось, что в безбелковом фильтрате озвученного раствора белка появляются такого рода соединения — цистин, цистеин, глютатион и т. п. Появление таких соединений объяснялось возможным отщеплением боковых или конечных цепей белковой молекулы, что может иметь место в поле ультраакустических колебаний в результате окисляющего действия последних. Суждение об окисляющем действии ультразвука в данном случае оправдывается тем, что белки в электрохимическом отношении не отличаются от аминокислот. Окисление аминокислот под действием ультразвука установлено рядом исследований ([5], [6]). Процессы окисления в поле ультразвуковых волн возникают, вероятнее всего, в результате появления в озвучиваемой водной среде продуктов расщепления молекул воды — свободных валентно-ненасыщенных радикалов. Введение в белковый раствор веществ, которые обладают большим химическим сродством к свободным радикалам, защищает белок от химического действия ультразвука ([7]).

В настоящем сообщении приводятся данные, показывающие, что под влиянием ультразвуковых волн происходит распад белковых частиц с появлением белка с более низким молекулярным весом.

Для исследования нами был использован яичный альбумин и его комплексы с эргостеролом, имеющие удвоенный молекулярный вес (димеры). Димеры яичного альбумина были получены путем введения в белковую молекулу эргостерола, что приводит к образованию белково-стеролового комплекса, состоящего из двух молекул белка и молекулы эргостерола ([8], [9]).

Мономеры и димеры яичного альбумина хорошо растекаются на поверхности 5% раствора сернокислого аммония (pH 4,5) с образованием мономолекулярного протеинового слоя ([10]). Измерения поверхностного давления таких пленок проводились нами по методу Вильгельми с точностью до 0,05 дин/см. Молекулярный вес белка в монослое рассчитывался по изотерме сжимаемости белковой пленки ([11]). Снятие кривой зависимости площади, занимаемой белком, от поверхностного давления монослоя осуществлялось до и после озвучивания исследуемого белка.

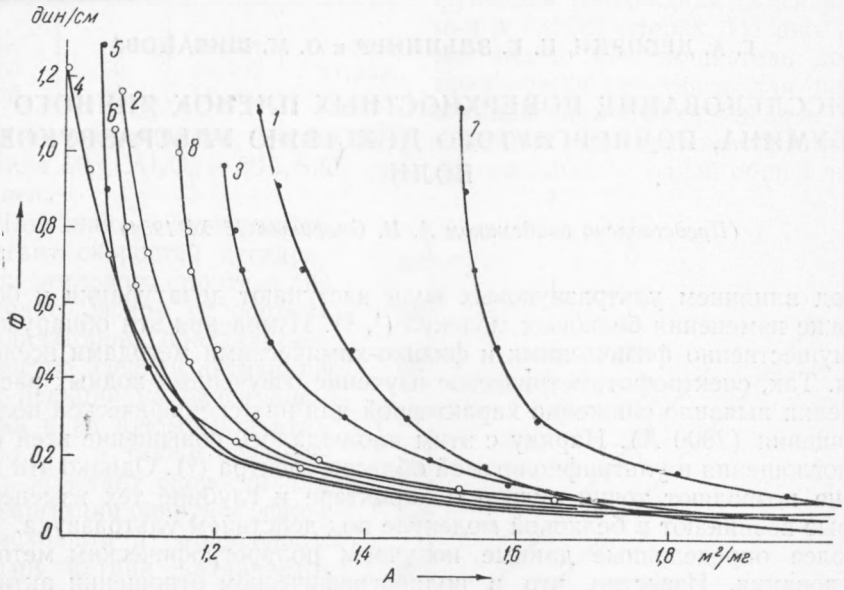


Рис. 1. Изотермы сжимаемости поверхностных пленок яичного альбумина, подвергнутого действию ультразвука. Яичный альбумин: *1* — неозвученный; *2* — после 10 мин. озвучивания; *3* — 20 мин.; *4* — 40 мин. Комплекс (димер): *5* — неозвученный; *6* — после 10 мин. озвучивания; *7* — 20 мин., *8* — 40 мин.

Озвучиванию подвергались белки в поле ультразвуковых волн, частота колебаний 740 кгц. Излучателем ультразвука служила вогнутая пьезокварцевая пластинка с фокусным расстоянием 10 см. Подводимое к кварцу переменное электрическое напряжение составляло 3000 в. Озвучивание производилось в мерных колбах, которые вносились в так называемый ультразвуковой фонтан (высота фонтана 10—12 см). Для каждой серии опытов физические условия озвучивания оставались одинаковыми, менялась только продолжительность озвучивания. Озвучивался 2,65% водный раствора белка, pH 4,5. При таком pH димеры яичного альбумина не диссоциируют и сохраняют удвоенный молекулярный вес. После озвучивания отфильтровывался каогулят и снова определялась концентрация белка в фильтрате. Как правило, она уменьшалась не более чем на 5—10% (от 2,65 до 2,4%).

На рис. 1 даны кривые зависимости площади, занимаемой белком в монослое *A* от поверхностного давления Ф. Как видно, площадь, занимаемая белком на поверхности, зависит от продолжительности воздействия ультразвуковых волн, которому предварительно подвергался изучаемый белок. В случае мономеров названная площадь уменьшается при малых экспозициях ультразвука, возрастает при несколько большей экспозиции (20 мин.), а при более длительном озвучивании вновь уменьшается. Значительное увеличение предельной площади в монослое при определенной продолжительности озвучивания наблюдалось и при исследовании димеров яичного альбумина. Предельная площадь неозвученного димера со-

ставляла 1,01 м²/мг, после 20-минутного озвучивания 1,455 м²/мг, а 40-минутная экспозиция вызывала уменьшение этой площади до 1,09 м²/мг. Результаты типичного опыта приведены в табл. 1.

Таблица 1

Действие ультразвука на яичный альбумин и его комплекс с эргостеролом (димер)

Мономер (яичный альбумин)			Димер (яичный альбумин + эргостерол)		
продолжит. озвучивания, мин.	мол. вес	предельн. площадь в монослое, м²/мг	продолжит. озвучивания мин.	мол. вес	предельн. площадь в монослое, м²/мг
—	40 000	1,2	—	70 000	1,01
10	40 000	1,03	10	70 000	1,04
20	35 500	1,15	20	54 800	1,455
40	30 700	0,94	40	55 000	1,09

Молекулярные веса озвученного яичного альбумина (мономеров и димеров), вычисленные по изотермам сжимаемости (см. рис. 2), оказались ниже, чем у неозвученных белков (см. также табл. 1). Уменьшение

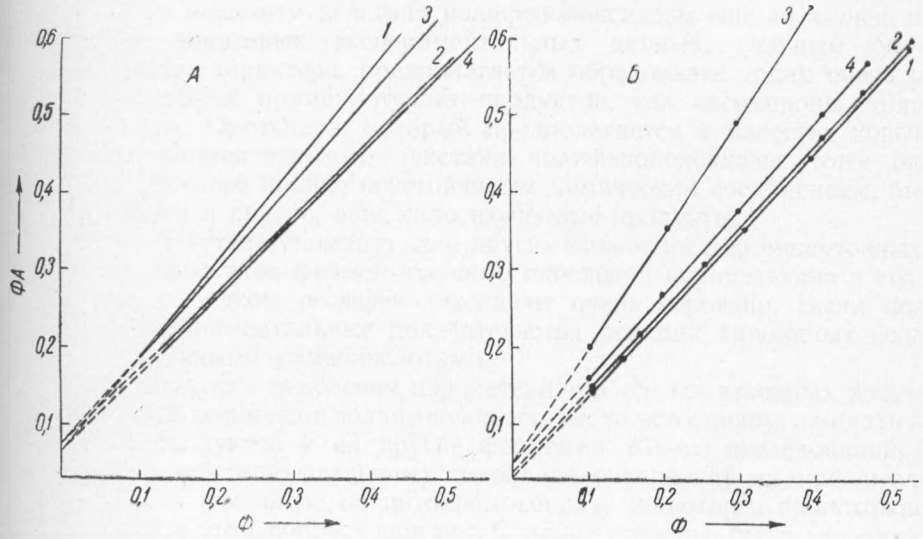


Рис. 2. Зависимость произведения ФА от поверхностного давления Ф для яичного альбумина (*А*) и для комплекса яичного альбумина с эргостеролом (*Б*), подвергнутых действию ультразвука. *1* — неозвученный; *2* — озвучивание в течение 10 мин.; *3* — 20 мин.; *4* — 40 мин.

молекулярного веса при относительно непродолжительном озвучивании достигало ~20% первоначального значения. При дальнейшем озвучивании уменьшение молекулярного веса белка не было столь выражено. В этом отношении не было заметных различий между мономерами и димерами белка.

Следует отметить, что между молекулярным весом озвученного белка и занимаемой им в монослое площадью нет строгой зависимости. Повидимому, здесь имеют значение структурные изменения белка, которые продолжают нарастать даже после того, когда уменьшение молекулярного веса озвучиваемого белка уже становится мало заметно.

Из рассмотрения табл. 1 мы делаем вывод, что при озвучивании растворов белка (как мономера, так и димера) от молекул отщепляются крупные «осколки», ибо отщепление низкомолекулярных пептидов не привело бы к заметному изменению молекулярного веса белка в монослое. Полученных данных пока недостаточно для суждения о том, ведет ли себя димер белка в этих условиях как единая молекула или он распадается на мономерные молекулы. Эти вопросы подлежат дальнейшему исследованию.

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

Поступило
28 VI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] И. Е. Эльпинер, ЖТФ, **21**, 1205 (1951). [2] М. А. Хенох, Е. М. Лапинская, ДАН, **80**, 921 (1951). [3] Е. М. Лапинская, А. И. Миронова, М. А. Хенох, ДАН, **95**, 109 (1954). [4] И. Е. Эльпинер, Бюлл. эксп. биол. и мед., **9**, 208 (1950). [5] И. Е. Эльпинер, И. Б. Збарский, В. Н. Харламова, ДАН, **73**, 1255 (1950). [6] P. Grabar, R. Prudhome, C. R., **226**, 1821 (1948). [7] И. Е. Эльпинер, М. Ф. Колесникова, ДАН, **75**, 837 (1950). [8] Г. А. Деборин, Л. Б. Горбачева, ДАН, **82**, 943 (1952). [9] Г. А. Деборин, Л. Б. Горбачева, Биохимия, **18**, 618 (1953). [10] Г. А. Деборин, Л. Б. Горбачева, ДАН, **95**, 317 (1954). [11] H. B. Bull, Adv. Pract. Chem., **3**, 97 (1949).