Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 2

БИОХИМИЯ

А. Г. ПАСЫНСКИЙ, М. С. ВОЛКОВА и В. П. БЛОХИНА

ИЗОТОПНАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕНАТУРАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В БЕЛКАХ *

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 XII 1954)

Денатурация белковых веществ, как известно, сопровождается повышением химической реактивности ряда функциональных групп белка: сульфгидрильных, фенольных ([1]), аминогрупп ([1, 2]) и др., а также повышением адсорбционной способности белков по отношению к ряду красителей — трифенилметановым ([3]), конгорот ([4]) и др. Измерение адсорбции красителей оказалось, в частности, полезным методом определения ранних стадий денатурационных изменений в белках, когда другие методы контроля денатурации (по понижению растворимости, возрастанию вязкости и др.) оказываются еще недостаточно чувствительными. Нами было выяснено (в 1952 г.), что повышение адсорбционной способности белков при денатурации проявляется также и по отношению к меченому метионину (с S^{35}), преимущество применения которого заключается в возможности измерения ничтожно малых количеств адсорбированного белком вещества.

Опыты проводились с растворами чистого сухого препарата серумальбумина человека, полученного методом электрофоретического выделения и высоковакуумной сушки. В большинстве опытов навеска в 30 мг серумальбумина человека растворялась в 1 мл боратного буфера (*M*/15, pH 8,5) и к раствору добавлялось 0,5 мл водного раствора меченого метионина, содержание которого обычно рассчитывалось таким образом, чтобы в 1 мл смеси было от 10 тыс. до 50 тыс. имп/мин (это различие сравнительно мало отражается на результатах опытов). Денатурация белка производилась различными способами: нагреванием, встряхиванием, действием спирта, облучением ультрафиолетовыми или рентгеновскими лучами и т. п. В тех случаях, когда при денатурации выпадал осадок белка (например, при кипячении), он просто отфильтровывался; если же осадка белка не образовывалось (например, при денатурации встряхиванием или облучением), белок осаждался добавлением к раствору равного объема (1,5 мл) 10% трихлоруксусной кислоты. В большинстве опытов отфильтрованный осадок промывался на фильтре 50 раз смесью равных объемов 10% трихлоруксусной кислоты и боратного буфера; в некоторых опытах применялось повторное взмучивание и центрифугирование осадка (20 раз) с последующей промывкой на фильтре (10 раз). Контроль полноты промывки проводился по постоянству удельной активности осадка, так как контроль по падению активности в промывных жидкостях оказался менее надежным. В большинстве опытов после 15—20-й промывки удельная активность проб осадка достигала сравнительно постоянного значения, хотя в некоторых случаях снижение активности осадка продолжалось до 40—50-й промывки. После 50-й промывки осадок высушивался в тонком слое на латунной тарелочке (весом

* Основные результаты доложены на совещании при Отделении биологических наук Академии наук СССР 21 апреля 1953 г.

около 0,5 г) и активность навески осадка в 7—12 мг определялась измерением на торцовом счетчике. Полученные значения активности везде пересчитывались на 10 мг сухого осадка белка.

Опыты с исходным белком. Контрольные опыты были проведены с растворами исходного белка. Концентрация метионина в этих опытах составляла 24 000 имп/мин на 1 мл смеси. Смесь хранилась в рефрижераторе при 4°. Осаждение 10% трихлоруксусной кислотой было произведено в пробах (по 1,5 мл), взятых сразу после смешения белка с метионином, затем через 0,5 часа, 6, 24 и 48 час. после смешения. Активность на 10 мг сухого белка составляла во всех случаях около 50 имп/мин (данные везде приводятся за вычетом фона, который составлял около 7—10 имп/мин).

Денатурация белка нагреванием. Смесь раствора белка (20 мг в 1 мл смеси) и метионина (12 000 имп/мин в 1 мл смеси) нагревалась 20 мин. на кипящей водяной бане, после чего осадок белка отфильтровывался и подвергался описанной выше обработке. Активность отмытого сухого осадка белка (на 10 мг) в различных опытах колебалась от 400 до 657 имп/мин. Интересно, что уже после 20-минутного нагревания при 37° активность осадка повышалась до 150—200 имп/мин. Если тепловая денатурация белка производилась отдельно, а потом к образовавшемуся осадку добавлялось то же количество метионина, смесь выдерживалась 30 мин. и уже после этого производилась фильтрация и промывание осадка, то в этом случае активность осадка была гораздо ниже и составляла лишь около 80 имп/мин. Кроме серумальбумина человека, в опытах по тепловой денатурации испытывался также цельный белок яйца, который после совместного с метионином (30 000 имп/мин) 20-минутного нагревания дал активность осадка 300 имп/мин.

Денатурация белка спиртом. К 1,5 мл смеси растворов белка и метионина (50 тыс. имп/мин · мл) прибавлялось 7,5 мл этилового спирта. Осадок белка через 30 мин. отфильтровывался, после чего обрабатывался описанным выше образом. Активность отмытого сухого осадка составляла 120 имп/мин.

Денатурация белка встряхиванием. Смесь белка и метионина (50 тыс. имп/мин · мл), осажденная 10% трихлоруксусной кислотой, после 18-часового встряхивания на качалке дала активность осадка 251 имп/мин.

Денатурация белка ультрафиолетовыми лучами. Смесь белка и метионина (40 тыс. имп/мин · мл) наливалась в чашку Петри, прикрытую сверху целлофаном, и облучалась при помощи кварцевой лампы ПРК-2 на расстоянии 35 см, при охлаждении облучаемого раствора льдом. Интенсивность облучения составляла около 1 млн эрг/см^2 · мин при продолжительности облучения от 1 мин. до 1 часа. Активность осадка в опыте с 1-минутным облучением составляла 86 имп/мин, при 5 мин. облучения 110, после 15 мин. 200, после 30 мин. 280, после 60 мин. 300 имп/мин. Если же раствор белка облучался отдельно в течение 90 мин. и необходимое количество метионина добавлялось к белку после облучения (причем смесь выдерживалась 30 мин. перед осаждением трихлоруксусной кислотой), то, как и в случае аналогичного опыта при тепловой денатурации белка, активность осадка была ниже и составляла лишь около 100 имп/мин.

Денатурация белка рентгеновскими лучами. Смесь белка и метионина (36 тыс. имп/мин · мл) облучалась при помощи рентгеновской терапевтической трубки Т-200 (160 кв, 5 ма) на расстоянии в 20 см от трубки до места облучения. Раствор помещался в бюксе, закрытом целлофаном; толщина облучаемого слоя составляла 1—1,5 мм. Интенсивность облучения составляла 400 г/мин. Дальнейшая обработка раствора производилась обычным образом. Активность осадка при дозе в 10 000 г составляла 160 имп/мин, при 5000 г — 105, при 3000 г — 88, при

2000 г — 70 и при 1000 г — 55 имп/мин. Таким образом, устанавливаемый порог действия для 2% раствора составляет около 2000 г.

Основные результаты опытов сведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что при различных способах денатурации поглощение белком метионина значительно возрастает, даже в условиях, при которых возможность влияния микробных загрязнений была полностью исключена. Хотя абсолютные величины поглощения могут значительно колебаться в зависимости от свойств препарата белка, степени его исходной денатурированности, условий проведения опыта и пр., все же из приведенных данных видно, что наличие денатурационного изменения и приблизительное соответствие величины поглощения глубине денатурации могут быть определенно установлены в каждой данной серии опытов. Вследствие высокой чувствительности изотопной методики этим путем могут быть установлены весьма тонкие денатурационные изменения, которые не могут быть определены при помощи каких-либо других физико-химических методов, например, при таких воздействиях, как нагревание в течение 20 мин. при 37°, ультрафиолетовое облучение в течение 1 мин., рентгеновское облучение при дозе 2000 г и др. Если методы измерения растворимости, вязкости, оптического вращения, титра сульфгидрильных групп и др. позволяют определить наличие денатурационных изменений при глубине денатурации не менее 10%, то чувствительность изотопной методики в некоторых случаях может быть на 1—2 порядка выше. Тем не менее несомненно, что теоретически возможная предельная чувствительность метода далеко не достигается в описанных выше опытах. Наиболее существенным ограничением метода является, повидимому, взаимное насыщение проявляющихся при денатурации активных группировок белковых молекул, вследствие чего лишь небольшая часть их используется для связывания метионина (вероятно, то же ограничение существует и при адсорбции красителей денатурированными белками ([3])). Легко показать, что если бы каждая денатурированная молекула белка связывала хотя бы одну молекулу метионина, то активность осадка должна была быть в десятки раз выше наблюдаемой на опыте. Нами было найдено, что при осаждении белка из более разбавленных растворов, в которых взаимодействие белковых молекул ослаблено, удельная активность осадка действительно может быть значительно повышена. Так например, при 20-минутном кипячении смеси белка с метионином (100 тыс. имп/мин в 1 мл смеси) активность 10 мг промытого сухого осадка при обычном содержании 30 мг белка в пробе составляла 338 имп/мин, при содержании 20 мг белка в пробе 730 имп/мин, при 10 мг белка в пробе 1000 имп/мин и при 5 мг белка в пробе 1900 имп/мин. По той же причине, вероятно, активность осадков, полученных при последующем добавлении метионина S^{35} к денатурированному белку (см. выше опыт с нагреванием и облучением белка) значительно меньше, чем активность осадков, полученных при денатурации белка в присутствии метионина, когда проявляющиеся активные группы могут сразу реагировать с метионином в момент денатурации.

Таблица 1

Влияние денатурации белка на поглощение меченого метионина

Обработка препарата	Активность в имп/мин на 10 мг осадка белка
Исходный белок	50
Денатурация	
Нагреванием (20 мин.)	400—650
Встряхиванием (18 час.)	250
Спиртом (5 : 1)	120
Ультрафиол. лучами (1 час)	300
То же (1 мин.)	86
Рентгеновск. лучами (10 000 г)	160
То же (2000 г)	70

Наблюдаемое повышение удельной активности осадка при понижении

концентрации белка было нами использовано для дальнейшего повышения чувствительности метода. Оказалось, что при рентгеновском облучении 0,1% растворов серумальбумина человека удельная активность на 10 мг осадка белка составляет при дозе 4000 r 190 имп/мин, при 1000 r — 100, при 500 r — 72 и при 400 r — 67 имп/мин (в контроле 50 имп/мин). Таким образом, в 0,1% растворах можно достаточно отчетливо установить действие всего лишь 400—500 r, т. е. установить наличие молекулярных изменений в белках непосредственно при биологических дозах облучения. В аналогичных опытах с ультрафиолетовым облучением можно было установить наличие изменений в белках уже при 30-секундном облучении.

Относительно природы активных групп белковых молекул, участвующих в связывании метионина, в настоящее время можно высказать лишь предварительные соображения. Возможно, что такими группировками являются сульфгидрильные группы белка, способные реагировать с S-атомами метионина, тем более, что высвобождение или активация сульфгидрильных групп белка при денатурации является хорошо известным фактом. Для проверки предположения о роли сульфгидрильных групп нами был проведен опыт по денатурации (кипячением в течение 20 мин.) смеси белка (30 мг) с метионином (100 тыс. имп/мин на 1 мл смеси) в присутствии цистеина (8 мг в пробе); при этом активность 10 мг осадка составляла лишь 48 имп/мин вместо 338 имп/мин в аналогичном опыте, проведенном без цистеина. Повидимому, избыток сульфгидрильных групп цистеина (примерно 30-кратный избыток по сравнению с содержанием этих групп в белке) препятствовал реакции связывания метионина белком. Таким образом, повышенное связывание метионина при денатурации, возможно, происходит с участием сульфгидрильных групп белка.

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

Поступило
20 XII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] M. Anson, Les Proteins, Bruxelles, 1953, p. 201. [2] R. Porter, Biochem. Biophys. Acta, **2**, 105 (1948). [3] А. Браун, Биохимия, **16**, 399 (1951); **13**, 409 (1948). [4] F. Haurowitz, F. Di Monia, Sh. Tekman, J. Am. Chem. Soc., **74**, 2265 (1952).